十一五

生物化学



主　编　查锡良
副主编　周春燕

人民卫生出版社

目　录

第一篇　生物大分子的结构与功能

第二篇　物质代谢及其调节

第四篇 专 题 篇

绪　论

生物化学（biochemistry）是研究生物体内化学分子与化学反应的基础生命科学，从分子水平探讨生命现象的本质。生物化学早期主要采用化学、物理学和数学的原理和方法，研究各种形式的生命现象，随着研究的发展，融入了生理学、细胞生物学、遗传学和免疫学等的理论和技术，加之近年来生物信息学的介入，使之与众多学科有着广泛的联系和交叉。生物化学主要研究生物体分子结构与功能、物质代谢与调节以及遗传信息传递的分子基础与调控规律等。

20 世纪 50 年代，生物化学发展进入了分子生物学（molecular biology）时期。通常将研究核酸、蛋白质等生物大分子的结构、功能及基因结构、表达与调控的内容，称为分子生物学。分子生物学的发展揭示了生命本质的高度有序性和一致性，是人类在认识论上的重大飞跃。从广义上理解，分子生物学是生物化学的重要组成部分，也被视作生物化学的发展和延续，因此，分子生物学的飞速发展，无疑为生物化学的发展注入了生机和活力。近年来迅猛发展的生物化学学科，研究成果累累，促进了相关和交叉学科，特别是医学的发展，已成为生命科学的重要学科之一。

第一节　生物化学发展简史

生物化学的起始研究可追溯至 18 世纪，而在 20 世纪初期作为一门独立的学科蓬勃发展起来了，近 50 年来又有许多重大的进展和突破，成为生命科学领域重要的前沿学科之一。

一、叙述生物化学阶段

18 世纪中至 19 世纪末是生物化学的初期阶段，也称为叙述生物化学阶段，主要研究生物体的化学组成。期间的重要贡献有：对脂类、糖类及氨基酸的性质进行了较为系统的研究；发现了核酸；从血液中分离了血红蛋白；证实了连接相邻氨基酸的肽键的形成；化学合成了简单的多肽；发现酵母发酵产生醇并产生 CO_2，酵母发酵过程中存在“可溶性催化剂”，奠定了酶学的基础等。

二、动态生物化学阶段

从 20 世纪初期开始，生物化学学科蓬勃发展，进入了动态生物化学阶段。例如：在营养方面，发现了人类必需氨基酸、必需脂肪酸及多种维生素；在内分泌方面，发现了多种激素，并将其分离、合成；在酶学方面，认识到酶的化学本质是蛋白质，酶晶体制备获得成功；在物质代谢方面，由于化学分析及同位素示踪技术的发展与应用，对生物体内主要物质的代谢途径已基本确定，包括糖代谢途径的酶促反应过程、脂肪酸 β 氧化、尿素合成途径及三羧酸循环等。在生物能研究中，提出了生物能产生过程中的 ATP 循环学说。

三、分子生物学时期

20 世纪后半叶以来，生物化学发展的显著特征是分子生物学的崛起。期间，物质代

谢途径的研究继续发展，并重点进入合成代谢与代谢调节的研究。

1. DNA 双螺旋结构被发现 这一阶段，细胞内两类重要的生物大分子-蛋白质与核酸，成为研究的焦点，硕果累累。例如，20 世纪 50 年代初期发现了蛋白质的 α 螺旋的二级结构形式；完成了胰岛素的氨基酸全序列分析等。更具有里程碑意义的是 J. D. Watson 和 F. H. Crick 于 1953 年提出的 DNA 双螺旋结构模型，为揭示遗传信息传递规律奠定了基础，是生物化学发展进入分子生物学时期的重要标志。此后，对 DNA 的复制机制、RNA 的转录过程以及各种 RNA 在蛋白质合成过程中的作用进行了深入研究，提出了遗传信息传递的中心法则，破译了 RNA 分子中的遗传密码等。这些成果深化了人们对核酸与蛋白质的关系及其在生命活动中作用的认识。20 世纪 50 年代后期还揭示了蛋白质生物合成途径，确定了由合成代谢与分解代谢网络组成的“中间代谢”概念。

2. DNA 克隆使基因操作无所不能 20 世纪 70 年代，重组 DNA 技术的建立不仅促进了对基因表达调控机制的研究，使基因操作无所不能，而且使人们主动改造生物体成为可能。由此，相继获得了多种基因工程产品，大大推动了医药工业和农业的发展。转基因动植物和基因剔除（gene knock out）动物模型的成功是重组 DNA 技术发展的结果。基因诊断与基因治疗也是重组 DNA 技术在医学领域应用的重要方面。20 世纪 80 年代，核酶（ribozyme）的发现是人们对生物催化剂认识的补充。聚合酶链反应（PCR）技术的发明，使人们有可能在体外高效率扩增 DNA。这些成果都是分子生物学发展的重大事件。

3. 基因组学及其他组学的研究 20 世纪末发动的人类基因组计划（human genome project）是人类生命科学中的又一伟大创举。人类基因组计划是描述人类基因组和其他基因组特征，包括物理图谱、遗传图谱、基因组 DNA 序列测定。人类基因组计划采用了先产生“工作草图”的策略，即获取能覆盖全基因组的有用数据，然后再补充很多未知序列的间隙和验证不确切序列，终于在 2001 年 2 月由人类基因组计划和 Cerela 共同公布了人类基因组草图（Nature Feb. 15，409：860-921，2001；Science Feb. 16，291：1304-1351，2001），这无疑是人类生命科学历史上的一个重大里程碑，它揭示了人类遗传学图谱的基本特点，将为人类的健康和疾病的研究带来根本性的变革。

人类基因组计划的初步结果也给人们留下若干新的思考：果蝇的复杂度比线虫高，但它的基因总数（13500）却比线虫（18500）少；曾估计人类的基因组中应涵盖约 7 至 10 万个基因，然而实际上只有大约 3 万至 4 万个可翻译基因，仅仅是线虫或果蝇的两倍，说明人类的基因更加复杂，具有更多的选择性剪切，从而产生巨大数目的蛋白质产物。可见，发现和鉴定人类基因中蕴含的所有基因，仅是第一步，而对基因的结构、功能及其调控研究显得尤为重要。

因此，以基因编码蛋白质的结构与功能为重点之一的功能基因组研究已迅速崛起。当前出现的蛋白质组学（proteomics）领域，包括研究蛋白质的定位、结构与功能、相互作用以及特定时空的蛋白质表达谱等，已成为生物化学的又一研究热点。由于蛋白质具有更为复杂的三维结构，无疑确定人类所有蛋白质的结构比测定人类基因组序列更具挑战性。1997 年提出了转录组学（transcriptomics），研究细胞在某一功能状态下所含 mRNA 的类型与拷贝数。而事实上，RNA 的生物功能远超出了遗传信息传递作用的范围，因而我国科学家在 1998 年和 2000 年多次提到了“功能 RNA 组的研究”。除 mRNA、tRNA、rRNA 外，近年来一类小分子 RNA 受到广泛重视，已发现小分子 RNA 可参与基因表达调控；所有的小分子 RNA 被统称为非 mRNA 小 RNA（small non-messenger RNA，snmRNA），由此产生了 RNA 组学（RNomics）的概念，其主要研究 snmRNA 的种类、结构、功能等，探讨同一生物学不同组织细胞或同一细胞在不同时空状态下 snmRNA 的表达谱，及其功能的变化。

代谢组学（metabolomics）研究的是生物体对外源性物质的刺激、环境变化或遗传修饰所做出的所有代谢应答的全貌和动态变化过程，其研究对象为完整的多细胞生物系统，包括了生命个体与环境的相互作用。代谢组学着重于研究生物个体在疾病发生发展过程中和外源性物质如药物作用下代谢的整体变化。疾病代谢组学的研究，着重于寻找疾病发生发展的生物标记和指纹信息。

糖组学（glycomics）主要研究单个生物体所包含的所有聚糖的结构、功能（包括与蛋白质的相互作用）等生物学作用，糖组学的出现使人类可以更深刻理解第三类生物信息大分子——聚糖在生命活动中的作用。

总之，阐明人类基因组功能是一项多学科的任务，正吸引着生物、医学、化学、物理、数学、工程和计算机等领域的学者共同参与，从中整合所有基因组信息，分析各种数据并提取其生物学意义，因而产生了一门前景广阔的新兴学科——生物信息学（bioinformatics）。尽管生物化学与分子生物学的发展异常迅速，但人类基因组序列的揭晓仅是序幕而已，生命本质的阐明任重而道远。

四、我国科学家对生物化学发展的贡献

早在西方生物化学诞生之前，即公元前 21 世纪，我国人民已能造酒，这是我国古代用“曲”作“媒”（即酶）催化谷物淀粉发酵的实践。近代生物化学发展时期，我国生物化学家吴宪等在血液化学分析方面，创立了血滤液的制备和血糖测定法；在蛋白质研究中提出了蛋白质变性学说。我国生物化学家刘思职在免疫化学领域，用定量分析方法研究抗原抗体反应机制。新中国成立后，我国的生物化学迅速发展。1965 年，我国科学家首先采用人工方法合成了具有生物活性的牛胰岛素，解出了三方二锌猪胰岛素的晶体结构；1981 年，采用了有机合成和酶促相结合的方法成功地又合成了酵母丙氨酰 tRNA。此外，在酶学、蛋白质结构、生物膜结构与功能方面的研究都有举世瞩目的成就。近年来，我国的基因工程、蛋白质工程、新基因的克隆与功能、疾病相关基因的定位克隆及其功能研究均取得了重要的成果。特别要指出的是，人类基因组序列草图的完成也有我国科学家的一份贡献。

第二节 当代生物化学研究的主要内容

生物化学的研究内容十分广泛，包括生物个体的物质化学组成、化学变化、功能及其调节等，从分子水平阐明生物体生命活动的本质和规律。当代生物化学的研究主要集中在以下几个方面。

1. 生物分子的结构与功能 组成生物个体的化学成分，包括无机物、有机小分子和生物大分子。体内生物大分子的种类繁多，结构复杂，但其结构有一定的规律性，都是由基本结构单位按一定顺序和方式连接而形成的多聚体（polymer），分子量一般大于 10^4。核酸、蛋白质、多糖、蛋白聚糖和复合脂类等是体内重要的生物大分子，它们都是由各自基本组成单位构成的多聚体。例如，由核苷酸作为基本组成单位，通过磷酸二酯键连接形成多核苷酸——核酸；由氨基酸作为基本组成单位，通过肽键连接形成多肽链——蛋白质；聚糖也是由一定的基本单位聚合而成。生物大分子的重要特征之一是具有信息功能，由此也称之为生物信息分子。

对生物大分子的研究，除了确定其一级结构（基本组成单位的种类、排列顺序和方式）外，更重要的是研究其空间结构及其与功能的关系。分子结构是功能的基础，而功能

则是结构的体现。生物大分子的功能还需通过分子之间的相互识别和相互作用而实现。例如，蛋白质与蛋白质的相互作用在细胞信号转导中起重要作用；蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸、核酸与核酸的相互作用在基因表达调控中发挥着决定性作用。由此可见，分子结构、分子识别和分子的相互作用是执行生物信息分子功能的基本要素，而这一领域的研究是当今生物化学的热点之一。

2. 物质代谢及其调节 生命体不同于无生命体的基本特征是新陈代谢。每个个体一刻不停地与外环境进行物质交换，摄入养料排出废物，以维持体内环境的相对稳定，从而延续生命。据估计，以 60 岁年龄计算，一个人在一生中与环境进行着大量的物质交换，约相当于 60000kg 水、10000kg 糖类、600kg 蛋白质以及 1000kg 脂类。因此，正常的物质代谢是正常生命过程的必要条件，若物质代谢发生紊乱则可引起疾病。目前对生物体内的主要物质代谢途径已基本清楚，但仍有众多的问题有待探讨。例如，物质代谢中的绝大多数化学反应是由酶催化的，酶的结构和酶量的变化对物质代谢的调节起着重要作用。物质代谢有序性调节的分子机制尚需进一步阐明。此外，细胞信息传递参与多种物质代谢及与其相关的生长、增殖、分化等生命过程的调节。细胞信息传递的机制及网络也是近代生物化学研究的重要课题。

3. 基因信息传递及其调控 基因信息传递涉及遗传、变异、生长、分化等诸多生命过程，也与遗传病、恶性肿瘤、心血管病等多种疾病的发病机制有关。因此，基因信息的研究在生命科学中的作用越显重要。现已确定，DNA 是遗传的主要物质基础，基因即 DNA 分子的功能片段。当今，基因分子生物学除了进一步研究 DNA 的结构与功能外，更重要的是研究 DNA 复制、基因转录、蛋白质生物合成等基因信息传递过程的机制及基因表达的时空规律。而目前基因表达调控主要集中在信号转导研究、转录因子研究和 RNA 剪辑研究三个方面。DNA 重组、转基因、基因剔除、新基因克隆、人类基因组及功能基因组研究等的发展，将大大推动这一领域的研究进程。

第三节 生物化学与医学

一、生物化学已成为生物学各学科之间、医学各学科之间相互联系的共同语言

以研究生命现象与本质为基础的生物学是一个涵盖众多学科的生命科学领域，包括形态学、分类学、生理学、生物化学、遗传学、生态学等。当今生物化学又是生命科学中进展迅速的重要学科之一，它的理论和技术已渗透到生物学各学科乃至基础医学和临床医学的各个领域，使之产生了许多新兴的交叉学科，如分子遗传学、分子免疫学、分子微生物学、分子病理学和分子药理学等。总而言之，生物化学已成为生物学各学科之间、医学各学科之间相互联系的共同语言。

二、生物化学为推动医学各学科发展作出了重要的贡献

生物化学是一门基础医学的必修课程，讲述正常人体的生物化学以及疾病过程中的生物化学相关问题，与医学有着紧密的联系。基础医学各学科主要是阐述人体正常、异常的结构与功能等，临床医学各学科则研究疾病发生、发展机制及诊断、治疗等，而生物化学为医学各学科从分子水平上研究正常或疾病状态时人体结构与功能乃至疾病预防、诊断与治疗，提供了理论与技术，对推动医学各学科的新发展作出了重要的贡献。例如，近年来对人们十分关注的心脑血管疾病、恶性肿瘤、代谢性疾病、免疫性疾病、神经系统疾病等

重大疾病进行了分子水平的研究，在疾病的发生、发展、诊断和治疗方面取得了长足的进步。疾病相关基因克隆、重大疾病发病机制研究、基因芯片与蛋白质芯片在诊断中的应用、基因治疗以及应用重组 DNA 技术生产蛋白质、多肽类药物等方面的深入研究，无不与生物化学的理论与技术相关。可以相信，随着生物化学与分子生物学的进一步发展，将给临床医学的诊断和治疗带来全新的理念。

生物化学与分子生物学的发展推动这些交叉学科发展的同时，也使自身吸取了众学科之长，更具生命力。随着近代医学的发展，越来越多地将生物化学的理论和技术应用于疾病的预防、诊断和治疗，从分子水平探讨各种疾病的发生、发展机制，也已成为当代医学研究的共同目标。

因此，学习和掌握生物化学知识，除理解生命现象的本质与人体正常生理过程的分子机制外，更重要的是为进一步学习基础医学其他各课程和临床医学打下扎实的生物化学基础。

(查锡良　周爱儒)

第一篇　生物大分子的结构与功能

本篇讨论生物大分子的结构与功能，包括蛋白质、核酸和酶的内容，共三章。

众所周知，机体是由数以亿万计分子量大小不等的分子组成。参与机体构成并发挥重要生理功能的生物大分子通常都有一定的分子结构规律，都是由一定的基本结构单位，按一定的排列顺序和连接方式而形成的多聚体。蛋白质和核酸是体内主要的生物大分子，各自有其结构特征，并分别行使不同的生理功能。核酸具有传递遗传信息等功能，而蛋白质几乎涉及所有的生理过程。两者的存在与配合，是生长、繁殖、运动、遗传、物质代谢等生命现象的基础。因此研究机体的分子结构与功能必须先深入了解这两类生物大分子。

酶是一类重要的蛋白质分子，是生物体内的催化剂。体内几乎所有的化学反应都由特异性的酶来催化，这为生物体能进行如此复杂而周密的新陈代谢及其精细的时空调节，提供了基本保证。由于酶的功能的重要性和特殊性，也列在这一篇加以讨论。

生物大分子的结构与功能是当今分子生物学研究的重要组成部分。

学习这一部分内容时，要重点掌握上述生物大分子物质的结构特性，重要功能及基本的理化性质与应用，这对理解生命的本质具有重要意义，也为后续课程的学习打下基础。

第一章　蛋白质的结构与功能

蛋白质是最主要的生命活动的载体，更是功能执行者。因此，蛋白质是生物体内最重要的生物大分子之一，早在1838年，荷兰科学家G. J. Mulder引用“protein”（源自希腊字proteios，意为primary）一词来表示这类分子。1833年从麦芽中分离淀粉酶；稍后几年，从胃液中分离到类似胃蛋白酶的物质，1864年血红蛋白被分离并结晶，推动了以酶为主体的蛋白质研究。19世纪末，证明蛋白质由氨基酸组成，并将氨基酸合成了多种短肽；20世纪初，应用X线衍射技术发现了蛋白质的二级结构——α-螺旋，以及完成了胰岛素一级结构测定；20世纪中叶各种蛋白质分析技术相继建立，促进了蛋白质研究的迅速发展；1962年，确定了血红蛋白的四级结构；20世纪90年代以后，随着人类基因组计划实施，功能基因组与蛋白质组计划的展开，特别是对蛋白质复杂多样的结构功能、相互作用与动态变化的深入研究，使蛋白质结构与功能的研究达到新的高峰。

第一节　蛋白质的分子组成

生物体结构越复杂其蛋白质种类和功能也越繁多。具有复杂空间结构的蛋白质在生物体内承担着惊人的动态与结构功能，其动态功能包括化学催化反应、免疫反应、血液凝

固、物质代谢调控、基因表达调控和肌肉收缩等功能；就其结构功能而言，蛋白质提供结缔组织和骨的基质、形成组织形态等。显而易见，普遍存在于生物界的蛋白质（protein）是生物体的重要组成成分和生命活动的基本物质基础，也是生物体中含量最丰富的生物大分子（biomacromolecule），约占人体固体成分的45%，而在细胞中可达细胞干重的70%以上。蛋白质分布广泛，几乎所有的器官组织都含有蛋白质。一个真核细胞可有成千上万种蛋白质，各自有特殊的结构和功能。

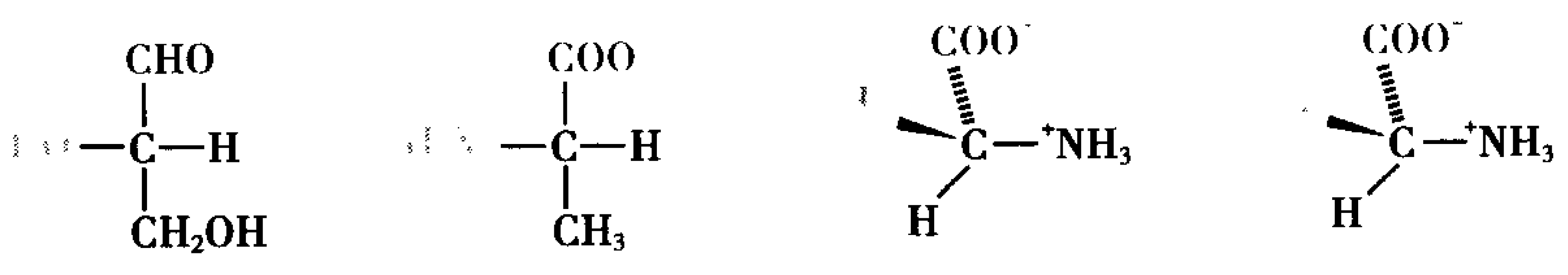
尽管蛋白质的种类繁多，结构各异，但元素组成相似，主要有碳（50%～55%）、氢（6%～7%）、氧（19%～24%）、氮（13%～19%）和硫（0%～4%）。有些蛋白质还含有少量磷或金属元素铁、铜、锌、锰、钴、钼等，个别蛋白质还含有碘。各种蛋白质的含氮量很接近，平均为16%。由于蛋白质是体内的主要含氮物，因此测定生物样品的含氮量就可按下式推算出蛋白质大致含量。

每克样品含氮克数×6.25×100＝100g样品中蛋白质含量（g%）

一、组成人体蛋白质的20种氨基酸均属于*L*-α-氨基酸

人体内所有蛋白质都是由20种氨基酸（amino acid）组成的多聚体，因此氨基酸是组成蛋白质的基本单位，但不同蛋白质的各种氨基酸的含量与排列顺序不同。蛋白质受酸、碱或蛋白酶作用而水解产生游离氨基酸。存在于自然界中的氨基酸有300余种，但组成人体蛋白质的氨基酸仅有20种，且均属*L*-α-氨基酸（除甘氨酸外）。

生物界中也有*D*-氨基酸，大都存在于某些细胞产生的抗生素及个别植物的生物碱中。此外，哺乳动物中也存在不参与蛋白质组成的游离*D*-氨基酸，如存在于前脑中的*D*-丝氨酸和存在于脑和外周组织的*D*-天冬氨酸，但均不参与蛋白质组成。



● 图1-1 *L*-甘油醛和*L*-氨基酸

由图1-1可见，连在—COO^-基上的碳称为α-碳原子，为不对称碳原子（甘氨酸除外），不同的氨基酸其侧链（*R*）各异。

二、氨基酸可根据侧链结构和理化性质进行分类

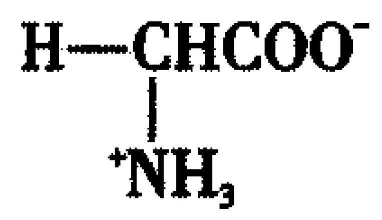
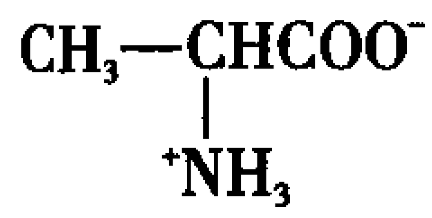
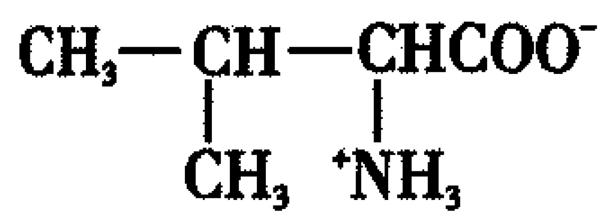
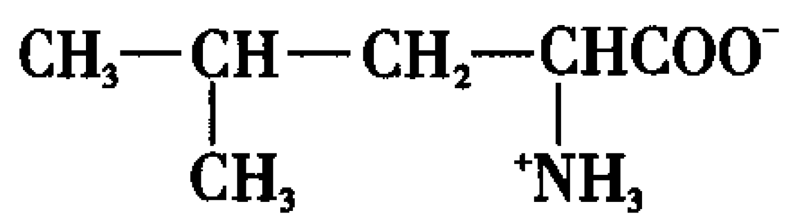
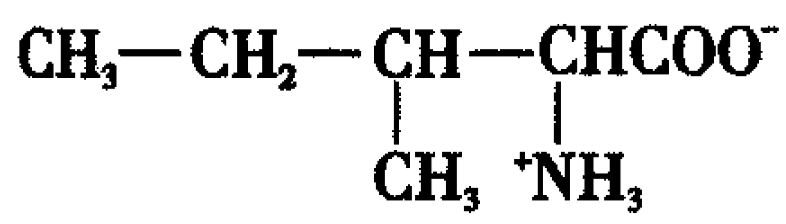
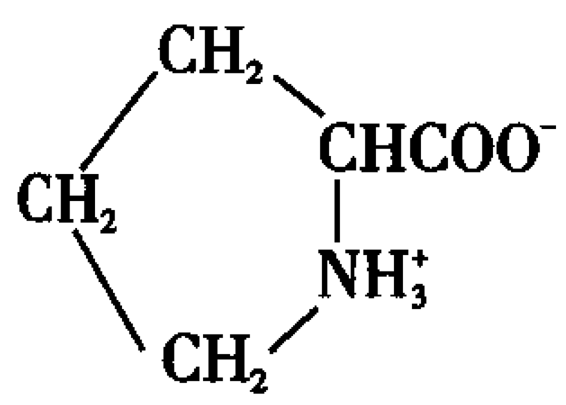
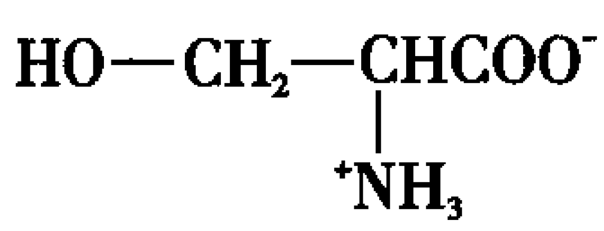
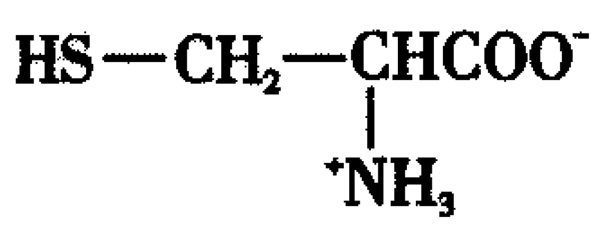
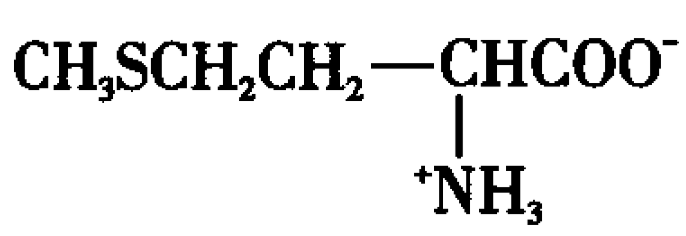
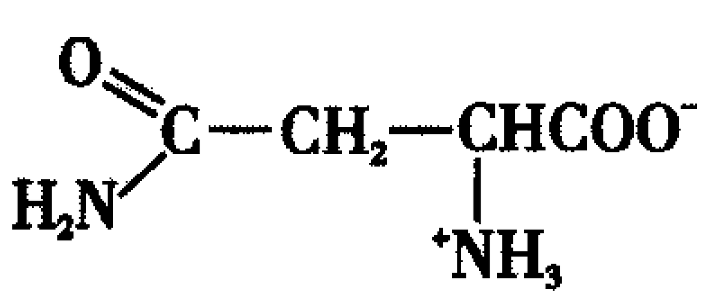
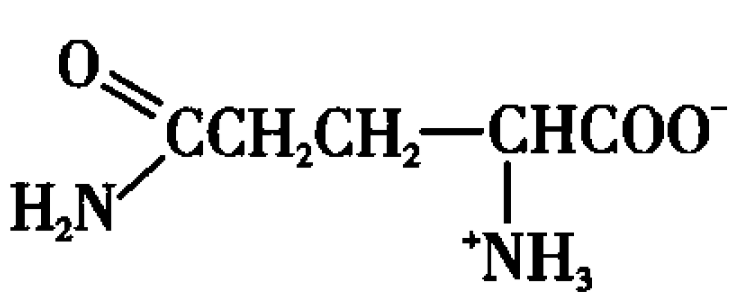
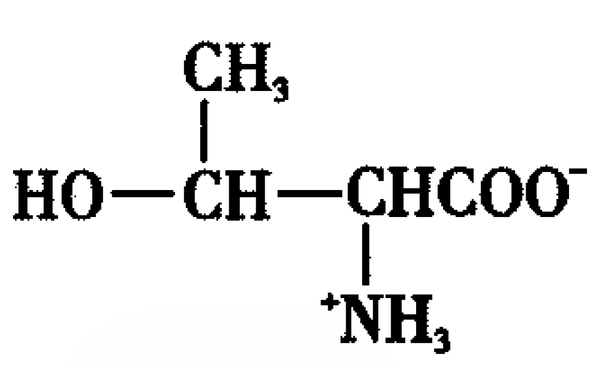
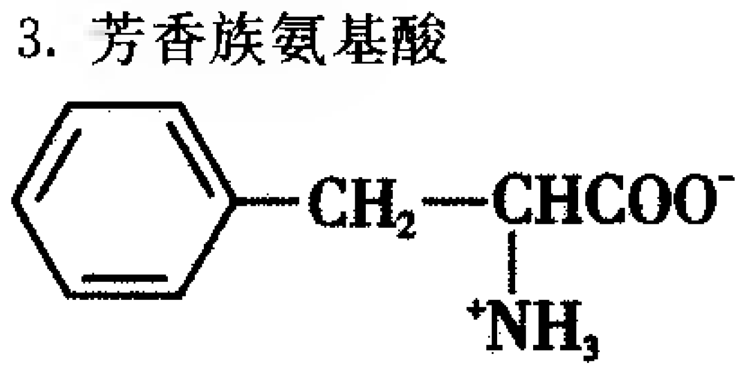
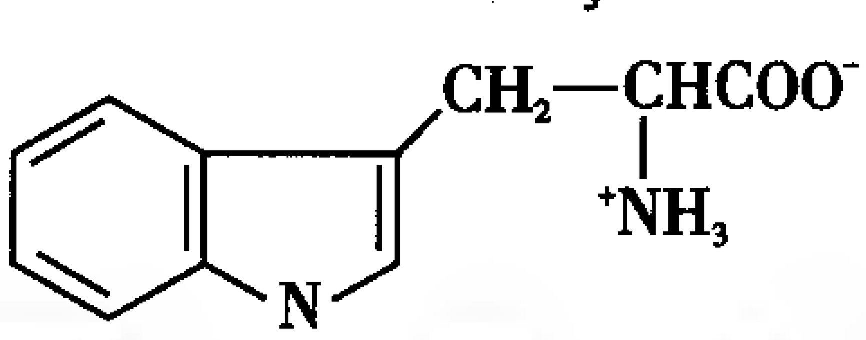
20种氨基酸根据其侧链的结构和理化性质可分成五类：①非极性脂肪族氨基酸；②极性中性氨基酸；③芳香族氨基酸；④酸性氨基酸；⑤碱性氨基酸（表1-1）。

一般而言，非极性脂肪族氨基酸在水溶液中的溶解度小于极性中性氨基酸；芳香族氨基酸中苯基的疏水性较强，酚基和吲哚基在一定条件下可解离；酸性氨基酸的侧链都含有羧基；而碱性氨基酸的侧链分别含有氨基、胍基或咪唑基。

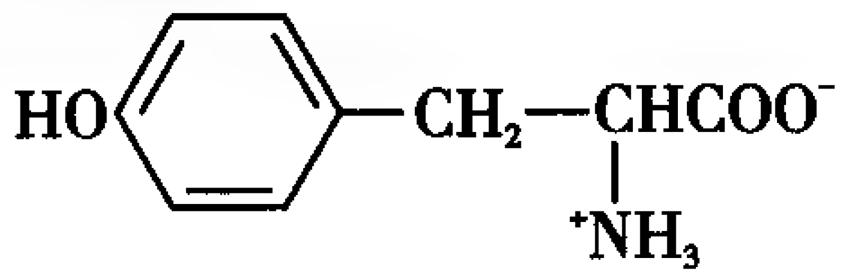
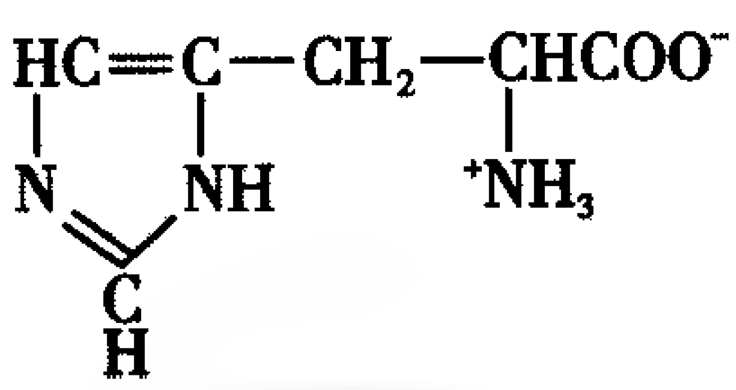
此外，20种氨基酸中脯氨酸和半胱氨酸结构较为特殊。脯氨酸应属亚氨基酸，N在杂环中移动的自由度受限制，但其亚氨基仍能与另一羧基形成肽链。脯氨酸在蛋白质合成加工时可被修饰成羟脯氨酸；半胱氨酸巯基失去质子的倾向较其他氨基酸为大，其极性最强；2个半胱氨酸通过脱氢后可以二硫键相结合，形成胱氨酸（图1-2）。蛋白质中有不少

半胱氨酸以胱氨酸形式存在。

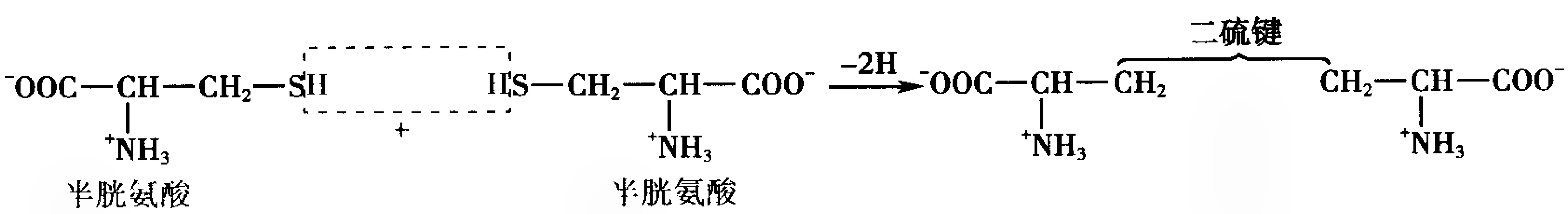
表 1-1 氨基酸分类

结构式	中文名	英文名	三字符号	一字符号	等电点 (pI)
1. 非极性脂肪族氨基酸					
	甘氨酸	glycine	Gly	G	5.97
	丙氨酸	alanine	Ala	A	6.00
	缬氨酸	valine	Val	V	5.96
	亮氨酸	leucine	Leu	L	5.98
	异亮氨酸	isoleucine	Ile	I	6.02
	脯氨酸	proline	Pro	P	6.30
2. 极性中性氨基酸					
	丝氨酸	serine	Ser	S	5.68
	半胱氨酸	cysteine	Cys	C	5.07
	蛋氨酸	methionine	Met	M	5.74
	天冬酰胺	asparagine	Asn	N	5.41
	谷氨酰胺	glutamine	Gln	Q	5.65
	苏氨酸	threonine	Thr	T	5.60
3. 芳香族氨基酸					
	苯丙氨酸	phenylalanine	Phe	F	5.48
	色氨酸	tryptophan	Trp	W	5.89

续表

结构式	中文名	英文名	三字符号	一字符号	等电点（pI）
	酪氨酸	tyrosine	Tyr	Y	5.66
4. 酸性氨基酸					
$HOOCCH_2—CH(^+NH_3)COO^-$	天冬氨酸	aspartic acid	Asp	D	2.97
$HOOCCH_2CH_2—CH(^+NH_3)COO^-$	谷氨酸	glutamic acid	Glu	E	3.22
5. 碱性氨基酸					
$NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2—CH(^+NH_3)COO^-$	赖氨酸	lysine	Lys	K	9.74
$NH_2C(=NH)NHCH_2CH_2CH_2—CH(^+NH_3)COO^-$	精氨酸	arginine	Arg	R	10.76
	组氨酸	histidine	His	H	7.59

在蛋白质翻译后的修饰过程中，脯氨酸和赖氨酸可分别被羟化为羟脯氨酸和羟赖氨酸。蛋白质分子中20种氨基酸残基的某些基团还可被甲基化、甲酰化、乙酰化、异戊二烯化和磷酸化等。这些翻译后修饰，可改变蛋白质的溶解度、稳定性、亚细胞定位和与其他细胞蛋白质相互作用的性质等，体现了蛋白质生物多样性的一个方面。



● 图 1-2 胱氨酸和二硫键

三、20种氨基酸具有共同或特异的理化性质

（一）氨基酸具有两性解离的性质

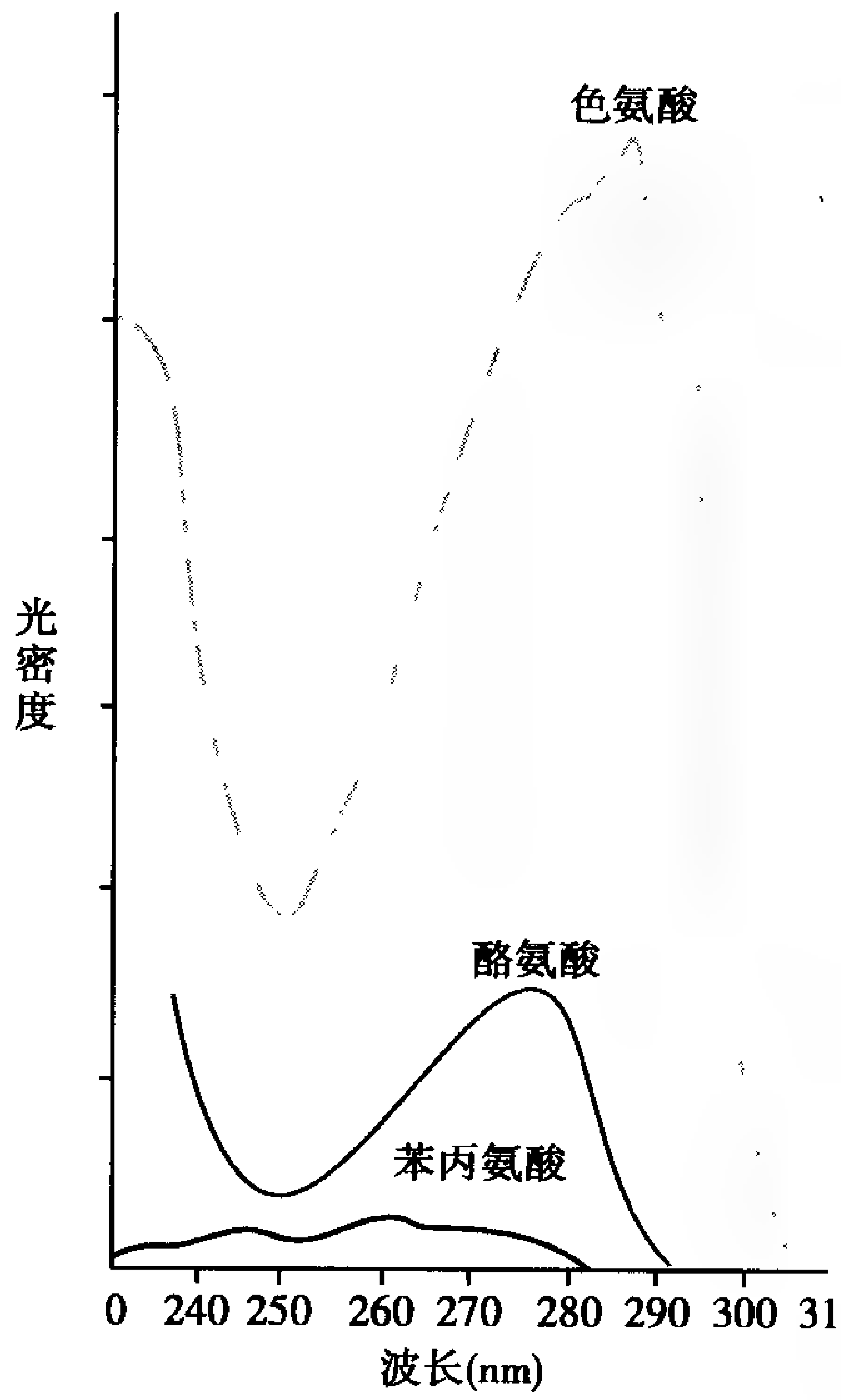
由于所有氨基酸都含有碱性的α-氨基和酸性的α-羧基，可在酸性溶液中与质子（H^+）结合成带正电荷的阳离子（$—NH^{3+}$），也可在碱性溶液中与 OH^- 结合，失去质子变成带负电荷的阴离子（$—COO^-$），因此氨基酸是一种两性电解质，具有两性解离的特性。氨基酸的解离方式取决于其所处溶液的酸碱度。在某一pH的溶液中，氨基酸解离成阳离子和阴离子的趋势及程度相等，成为兼性离子，呈电中性，此时溶液的pH称为该氨基酸的等电点（isoelectric point，pI）。

通常氨基酸的pI是由α-羧基和α-氨基的解离常数的负对数 pK_1 和 pK_2 决定的。pI计

算公式为：$pI=1/2\ (pK_1+pK_2)$。如丙氨酸 $pK_{COOH}=2.34$，$pK_{-NH_2}=9.69$，所以丙氨酸的 $pI=1/2\ (2.34+9.69)=6.02$。若一个氨基酸有三个可解离的基团，写出它们电离式后取兼性离子两边的 pK 值的平均值，即为此氨基酸的 pI 值。

（二）含共轭双键的氨基酸具有紫外吸收性质

根据氨基酸的吸收光谱，含有共轭双键的色氨酸、酪氨酸的最大吸收峰在 280nm 波长附近（图 1-3）。由于大多数蛋白质含有酪氨酸和色氨酸残基，所以测定蛋白质溶液 280nm 的光吸收值，是分析溶液中蛋白质含量的快速而简便的方法。



●图 1-3　芳香族氨基酸的紫外吸收

（三）氨基酸与茚三酮反应生成蓝紫色化合物

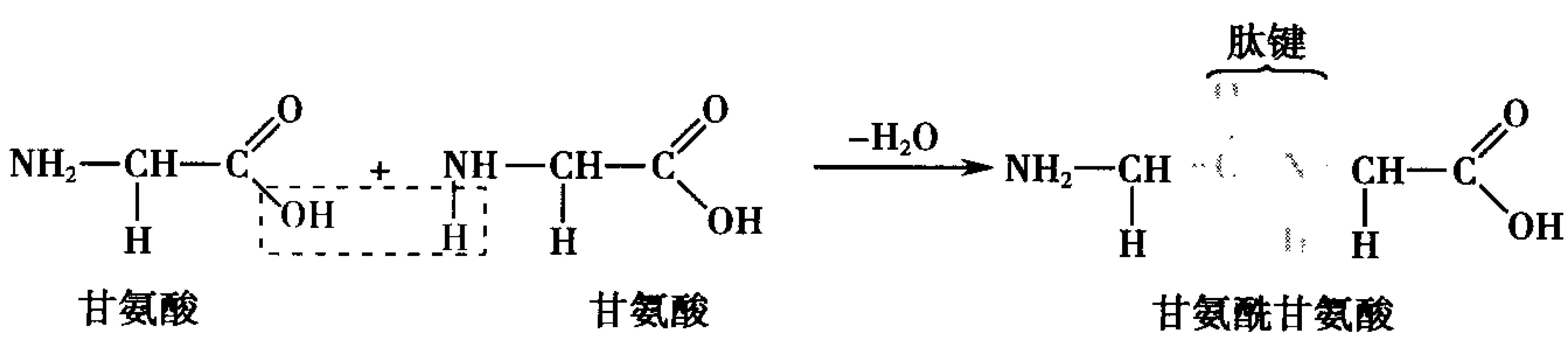
氨基酸与茚三酮水合物共加热时，氨基酸被氧化脱氨、脱羧，而茚三酮水合物被还原，其还原物可与氨基酸加热分解产生的氨结合，再与另一分子茚三酮缩合成为蓝紫色的化合物，此化合物最大吸收峰在 570nm 波长处。由于此吸收峰值的大小与氨基酸释放出的氨量成正比，因此可作为氨基酸的定量分析方法。

四、蛋白质是由许多氨基酸残基组成的多肽链

（一）氨基酸通过肽键连接而形成肽

早在 1890～1910 年间德国化学家 E. Fischer 已充分证明蛋白质中的氨基酸相互结合成肽（peptide），例如 1 分子甘氨酸的 α-羧基和 1 分子丙氨酸 α 氨基脱去 1 分子水，缩合成为甘氨酰丙氨酸，这是最简单的肽，即二肽。在甘氨酰丙氨酸分子中连接两个氨基酸的酰胺键称为肽键（peptide bond）（图 1-4）。二肽还可通过肽键与另一分子氨基酸缩合生成三肽。此反应可继续进行，依次生成四肽、五肽……一般来说，由 10 个以内氨基酸相连而成的肽称为寡肽（oligopeptide），而更多的氨基酸相连而成的肽称为多肽（polypeptide）。多肽链有两端，其游离 α 氨基的一端称氨基末端（amino terminal）或 N-端，游离 α 羧基的一端称为羧基末端（carboxyl terminal）或 C 端。肽链中的氨基酸分子因脱水缩合而基团不全，被称为氨基酸残基（residue）。

蛋白质就是由许多氨基酸残基组成的多肽链。一般而论，蛋白质通常含 50 个氨基酸以上，多肽则为 50 个氨基酸以下。例如，常把由 39 个氨基酸残基组成的促肾上腺皮质激素称为多肽，而把含有 51 个氨基酸残基、分子量为 5733 的胰岛素称为蛋白质。



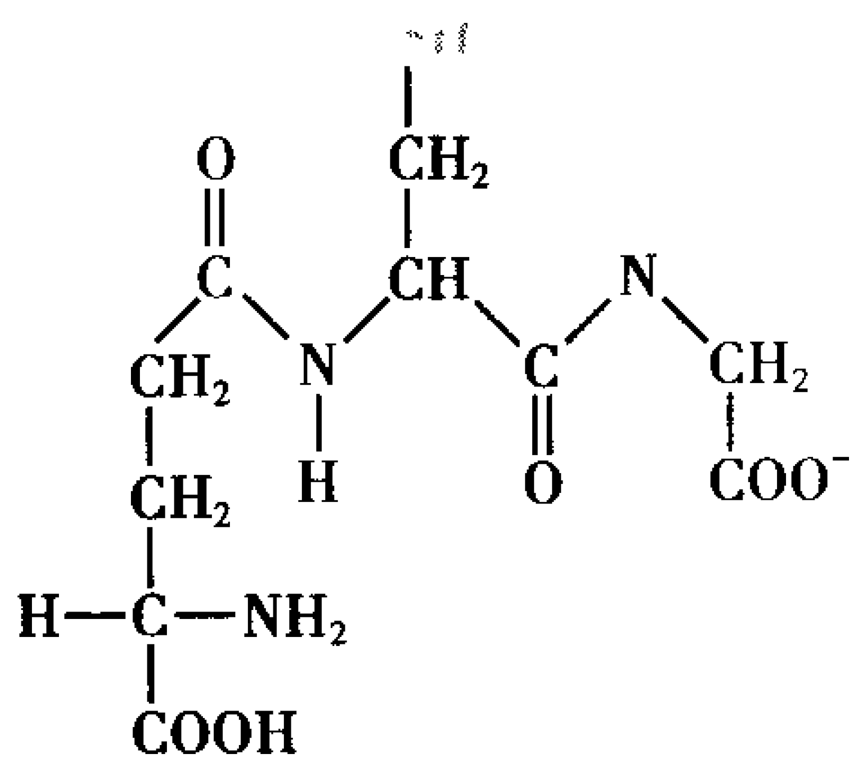
●图 1-4　肽与肽键

（二）体内存在多种重要的生物活性肽

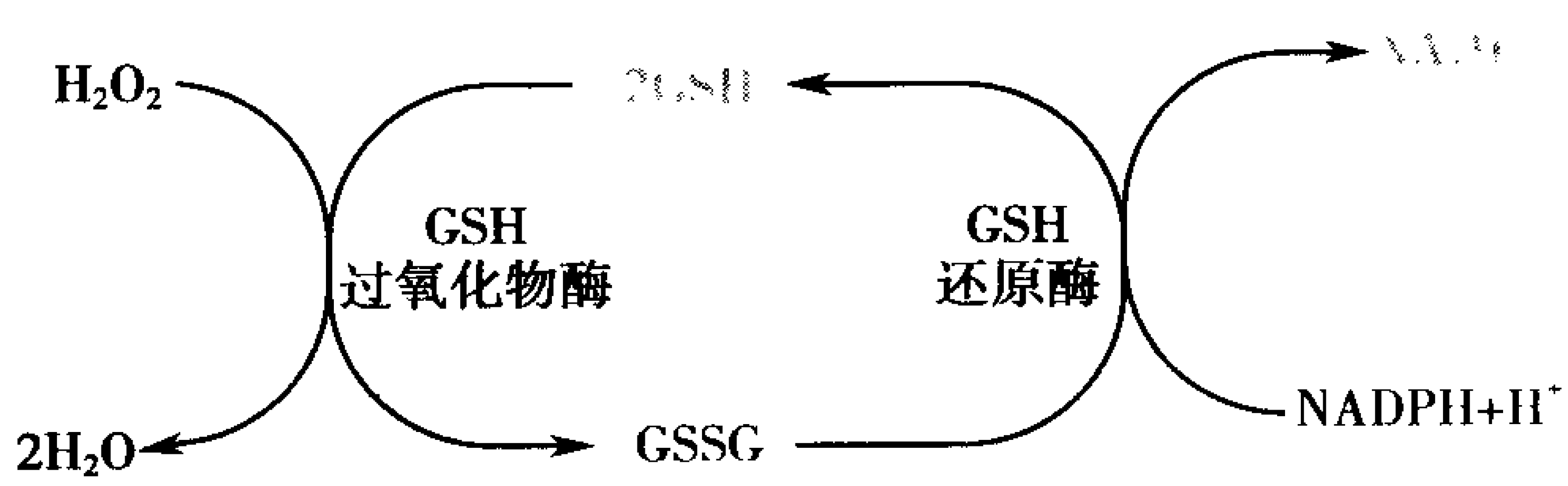
人体内存在许多具有生物活性的低分子量的肽，有的仅三肽，有的属寡肽或多肽，在

代谢调节、神经传导等方面起着重要的作用。随着肽类药物的发展，许多化学合成或重组DNA技术制备的肽类药物和疫苗已在疾病预防和治疗方面取得成效。

1. 谷胱甘肽（glutathione，GSH） GSH是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽。第一个肽键与一般不同，由谷氨酸γ-羧基与半胱氨酸的氨基组成（图1-5），分子中半胱氨酸的巯基是该化合物的主要功能基团。GSH的巯基具有还原性，可作为体内重要的还原剂，保护体内蛋白质或酶分子中巯基免遭氧化，使蛋白质或酶处在活性状态。在谷胱甘肽过氧化物酶的催化下，GSH可还原细胞内产生的H_2O_2，使其变成H_2O，与此同时，GSH被氧化成氧化型谷胱甘肽（GSSG）（图1-6），后者在谷胱甘肽还原酶催化下，再生成GSH。此外，GSH的巯基还有嗜核特性，能与外源的嗜电子毒物如致癌剂或药物等结合，从而阻断这些化合物与DNA、RNA或蛋白质结合，以保护机体免遭毒物侵害。

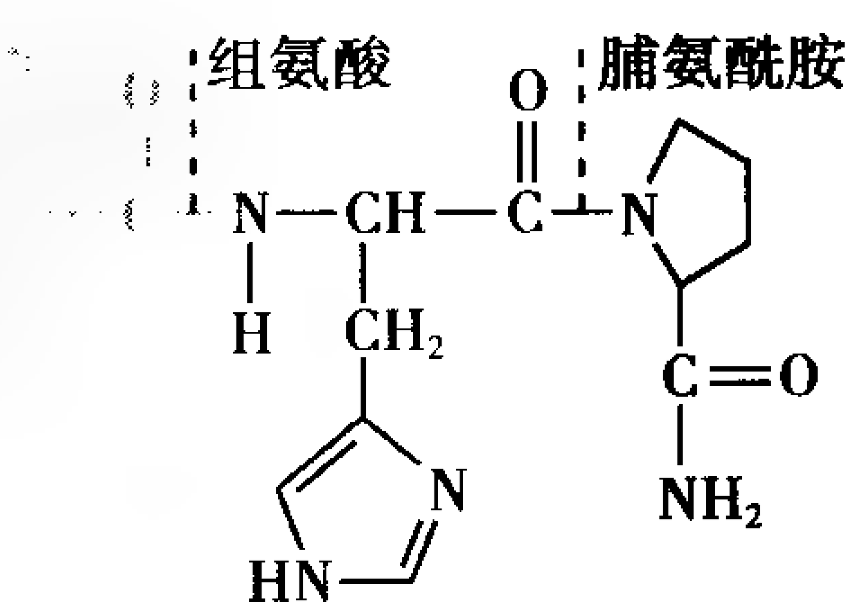


●图1-5 谷胱甘肽



●图1-6 GSH与GSSG间的转换

2. 多肽类激素及神经肽 体内有许多激素属寡肽或多肽，例如属于下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的催产素（9肽）、加压素（9肽）、促肾上腺皮质激素（39肽）、促甲状腺素释放激素（3肽）等。促甲状腺素释放激素是一个特殊结构的三肽（图1-7），其N末端的谷氨酸环化成为焦谷氨酸（pyroglutamic acid），C末端的脯氨酸残基酰化成为脯氨酰胺，它由下丘脑分泌，可促进腺垂体分泌促甲状腺素。



●图1-7 促甲状腺素释放激素（TRH）

有一类在神经传导过程中起信号转导作用的肽类被称为神经肽（neuropeptide）。较早发现的有脑啡肽（5肽）、β-内啡肽（31肽）和强啡肽（17肽）等。近年还发现孤啡肽（17肽），其一级结构类似于强啡肽。它们与中枢神经系统产生痛觉抑制有密切关系。因此很早就被用于临床的镇痛治疗。除此以外，神经肽还包括P物质（10肽）、神经肽Y等。随着脑科学的发展，相信将发现更多的在神经系统中起着重要作用的生物活性肽或蛋白质。

第二节 蛋白质的分子结构

蛋白质分子是由许多氨基酸通过肽键相连形成的生物大分子。人体内具有生理功能的蛋白质都是有序结构，每种蛋白质都有其一定的氨基酸百分组成、氨基酸排列顺序以及肽链空间的特定排布位置。因此由氨基酸排列顺序及肽链的空间排布等所构成的蛋白质分子结构，才真正体现蛋白质的个性，是每种蛋白质具有独特生理功能的结构基础。由于组成人体蛋白质的氨基酸有20种，且蛋白质的分子量均较大，因此蛋白质的氨基酸排列顺序和空间位置几乎是无穷尽的，足以为人体多达数以万计的蛋白质提供各异的氨基酸序列和特定的空间排布，完成生命所赋予的数以千万计的生理功能。1952年丹麦科学家

K. U. Linderstrom-Lang 建议将蛋白质复杂的分子结构分成 4 个层次，即一级、二级、三级和四级结构，后三者统称为高级结构或空间构象（conformation）。蛋白质的空间构象涵盖了蛋白质分子中的每一原子在三维空间的相对位置，它们是蛋白质特有性质和功能的结构基础。但并非所有的蛋白质都有四级结构，由一条肽链形成的蛋白质只有一级、二级和三级结构，由两条或两条以上多肽链形成的蛋白质才可能有四级结构。

一、氨基酸的排列顺序决定蛋白质的一级结构

蛋白质一级结构是理解蛋白质结构、作用机制以及与其同源蛋白质生理功能的必要基础。在蛋白质分子中，从 N 端至 C-端的氨基酸排列顺序称为蛋白质的一级结构（primary structure）。一级结构中的主要化学键是肽键，此外，蛋白质分子中所有二硫键的位置也属于一级结构范畴。牛胰岛素是第一个被测定一级结构的蛋白质分子，由英国化学家 F. Sanger 于 1953 年完成，并于 1958 年获得 Nobel 化学奖。图 1-8 为牛胰岛素的一级结构，胰岛素有 A 和 B 两条多肽链，A 链有 21 个氨基酸残基，B 链有 30 个氨基酸残基。如果把氨基酸序列（amino acid sequence）标上数码，应以氨基末端为 1 号，依次向羧基末端排列。牛胰岛素分子中有 3 个二硫键，1 个位于 A 链内，称为链内二硫键，由 A 链的第 6 位和第 11 位半胱氨酸的巯基脱氢而形成，另 2 个二硫键位于 A、B 两链间（图 1-8），称为链间二硫键。

```
A链 H2N-甘-异亮-缬-谷-谷酰-      -半胱-苏-丝-异亮-      -丝-亮-酪-谷酰-亮-谷-天冬酰-酪-      -天冬酰-COOH
         1   2   3  4   5          7 |  8   9  10         12 13 14  15   16 17  18    19          21
                                     S
                                     |
                                     S
                                     |
B链 H2N-苯丙-缬-天冬酰-谷酰-组-亮-半胱-甘-丝-组-亮-缬-谷-丙-亮-酪-亮-缬-      -甘-谷-精-甘-苯丙-苯丙-
         1   2    3     4   5  6   7   8  9  10 11 12 13 14 15 16 17 18        20 21 22 23  24   25
      酪-苏-脯-赖-丙-COOH
      26 27 28 29 30
```

图 1-8 牛胰岛素的一级结构

F. Sanger 对蛋白质和 DNA 序列测定的贡献

蛋白质一级结构对于了解蛋白质完整结构、作用机制以及与其有类同功能蛋白质的相互关系，显得十分重要。F. Sanger 于 1953 年首次测定了的胰岛素氨基酸序列，对于阐明胰岛素的生物合成和发挥生理功能的机制很重要。随后用这一方法原理，数以千万计的不同种系蛋白质氨基酸序列被揭晓。胰岛素由胰腺的胰岛细胞合成，刚合成时为一条无活性的单链，称为胰岛素原（proinsulin），含有 86 个氨基酸和 3 对链内二硫键。在胰岛细胞中，胰岛素原在氨基酸残基 30 和 31、65 和 66 之间经蛋白酶水解，产生 2 个分子，含 35 个氨基酸的 C-肽和含 A、B 两链的具有生物活性的胰岛素。1977 年 F. Sanger 与 A. Maxam、W. Gilbert 各自分别发现了测定 DNA 序列的技术，这两种技术的基本原理相同，但 Sanger 的方法更简易并被广泛应用，称为“直读法”。Sanger 对蛋白质、核酸序列测定所作出的重大贡献，分别于 1958 年和 1980 年两度获得诺贝尔化学奖，这是生物化学史上不多得的科学家。

体内种类繁多的蛋白质，其一级结构各不相同，一级结构是蛋白质空间构象和特异生

物学功能的基础。但随着蛋白质结构研究的深入，人们已认识到蛋白质一级结构并不是决定蛋白质空间构象的唯一因素。

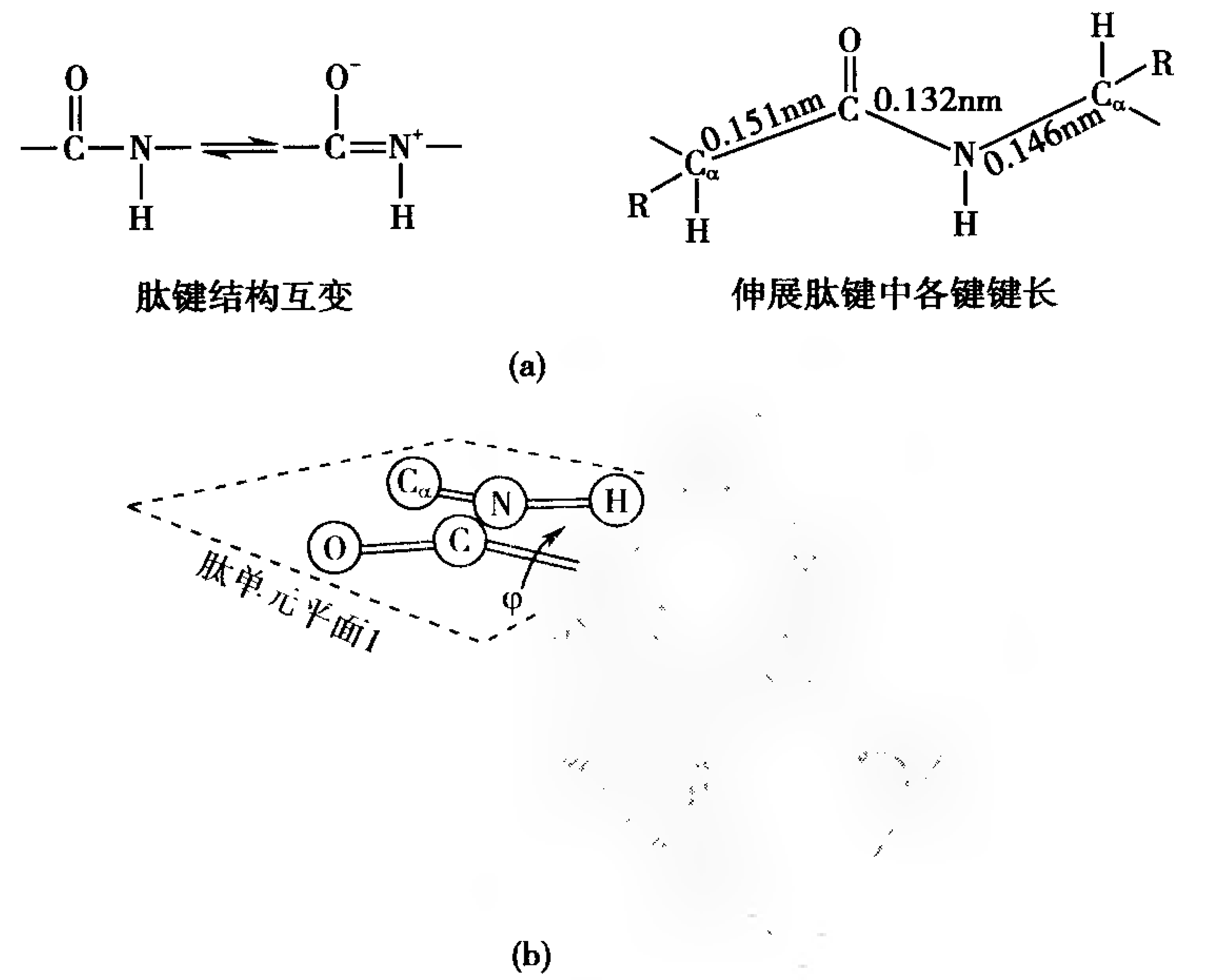
目前已知一级结构的蛋白质数量已相当可观，并且还以更快的速度增长。国际互联网有若干重要的蛋白质数据库（updated protein databases），例如 EMBL（European Molecular Biology Laboratory Data Library）、Genbank（Genetic Sequence Databank）和 PIR（Protein Identification Resource Sequence Database）等，收集了大量最新的蛋白质一级结构及其他资料，为蛋白质结构与功能的深入研究提供了便利。

二、多肽链的局部主链构象为蛋白质二级结构

蛋白质的二级结构（secondary structure）是指蛋白质分子中某一段肽链的局部空间结构，也就是该段肽链主链骨架原子的相对空间位置，并不涉及氨基酸残基侧链的构象。所谓肽链主链骨架原子即 N（氨基氮）、C_α（α-碳原子）和 CO（羰基碳）3 原子依次重复排列。蛋白质的二级结构主要包括 α 螺旋、β-折叠、β 转角和无规卷曲。由于蛋白质是生物大分子，分子量很大，因此，一个蛋白质分子可含有多种二级结构或多个同种二级结构，而且在蛋白质分子内空间上相邻的两个以上的二级结构还可协同完成特定的功能。

（一）参与肽键形成的 6 个原子在同一平面上

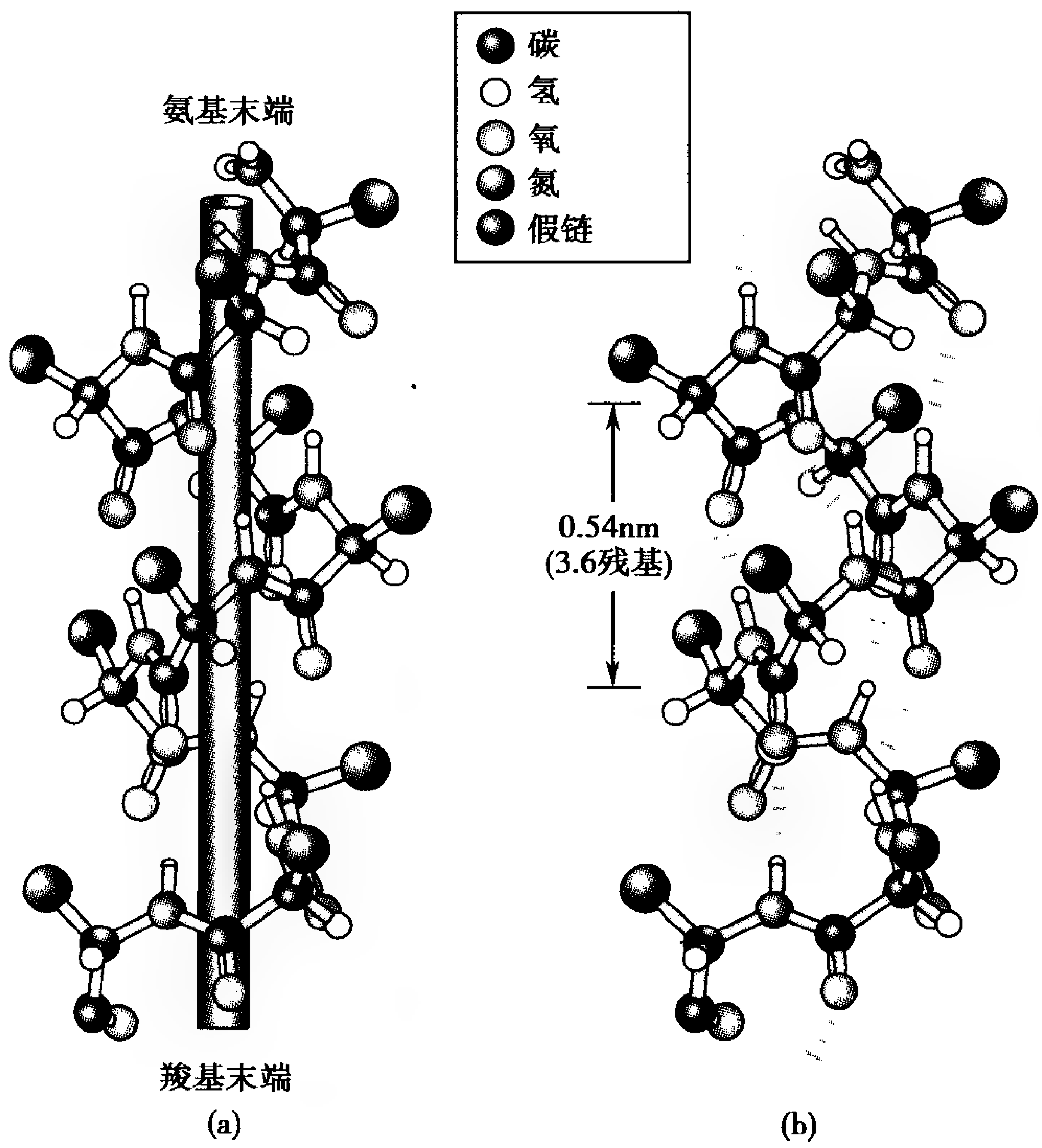
20 世纪 30 年代末 L. Pauling 和 R. B. Corey 应用 X 线衍射技术研究氨基酸和寡肽的晶体结构，其目的是要获得一组标准键长和键角，以推导肽的构象，最终提出了肽单元（peptide unit）概念。他们发现参与肽键的 6 个原子 $C_{\alpha1}$、C、O、N、H 和 $C_{\alpha2}$ 位于同一平面，$C_{\alpha1}$ 和 $C_{\alpha2}$ 在平面上所处的位置为反式（trans）构型，此同一平面上的 6 个原子构成了所谓的肽单元（图 1-9）。其中肽键（C—N）的键长为 0.132nm，介于 C—N 的单键长（0.149nm）和双键长（0.127nm）之间，所以有一定程度双键性能，不能自由旋转。而 C_α 分别与 N 和 CO 相连的键都是典型的单键，可以自由旋转，C_α 与 CO 的键旋转角度以 φ 表示，C_α 与 N 的键角以 ψ 表示（图 1-9）。也正由于肽单元上 C_α 原子所连的两个单键的自由旋转角度，决定了两个相邻的肽单元平面的相对空间位置。



●图 1-9 肽单元

（二）α-螺旋结构是常见的蛋白质二级结构

Pauling 和 Corey 根据实验数据提出了两种肽链局部主链原子的空间构象的分子模型，称为 α-螺旋（α-helix）和 β-折叠（β-pleated sheet），它们是蛋白质二级结构的主要形式。在 α-螺旋结构（图 1-10）中，多肽链的主链围绕中心轴做有规律的螺旋式上升，螺旋的走向为顺时针方向，所谓右手螺旋，其 ψ 为－47°，φ 为－57°。氨基酸侧链伸向螺旋外侧。每 3.6 个氨基酸残基螺旋上升一圈（即旋转 360°），螺距为 0.54nm。α-螺旋的每个肽键的 N—H和第四个肽键的羰基氧形成氢键，氢键的方向与螺旋长轴基本平衡。肽链中的全部肽键都可形成氢键，以稳固 α-螺旋结构。



●图 1-10 α-螺旋

一般而言，20 种氨基酸均可参与组成 α-螺旋结构，但是 Ala、Glu、Leu 和 Met 比 Gly、Pro、Ser 和 Tyr 更常见。在蛋白质表面存在的 α-螺旋，常具有两性特点，即由 3～4 个疏水氨基酸残基组成的肽段与由 3～4 个亲水氨基酸残基组成的肽段交替出现，致使 α 螺旋的一侧为疏水性氨基酸，另一侧为亲水性氨基酸，使之能在极性或非极性环境中存在。这种两性 α 螺旋可见于血浆脂蛋白、多肽激素和钙调蛋白激酶等。肌红蛋白和血红蛋白分子中有许多肽链段落呈 α 螺旋结构。毛发的角蛋白、肌肉的肌球蛋白以及血凝块中的纤维蛋白，它们的多肽链几乎全长都卷曲成 α-螺旋。数条 α-螺旋状的多肽链还可缠绕起来，形成缆索，从而增强了其机械强度，并具有可伸缩性（弹性）。

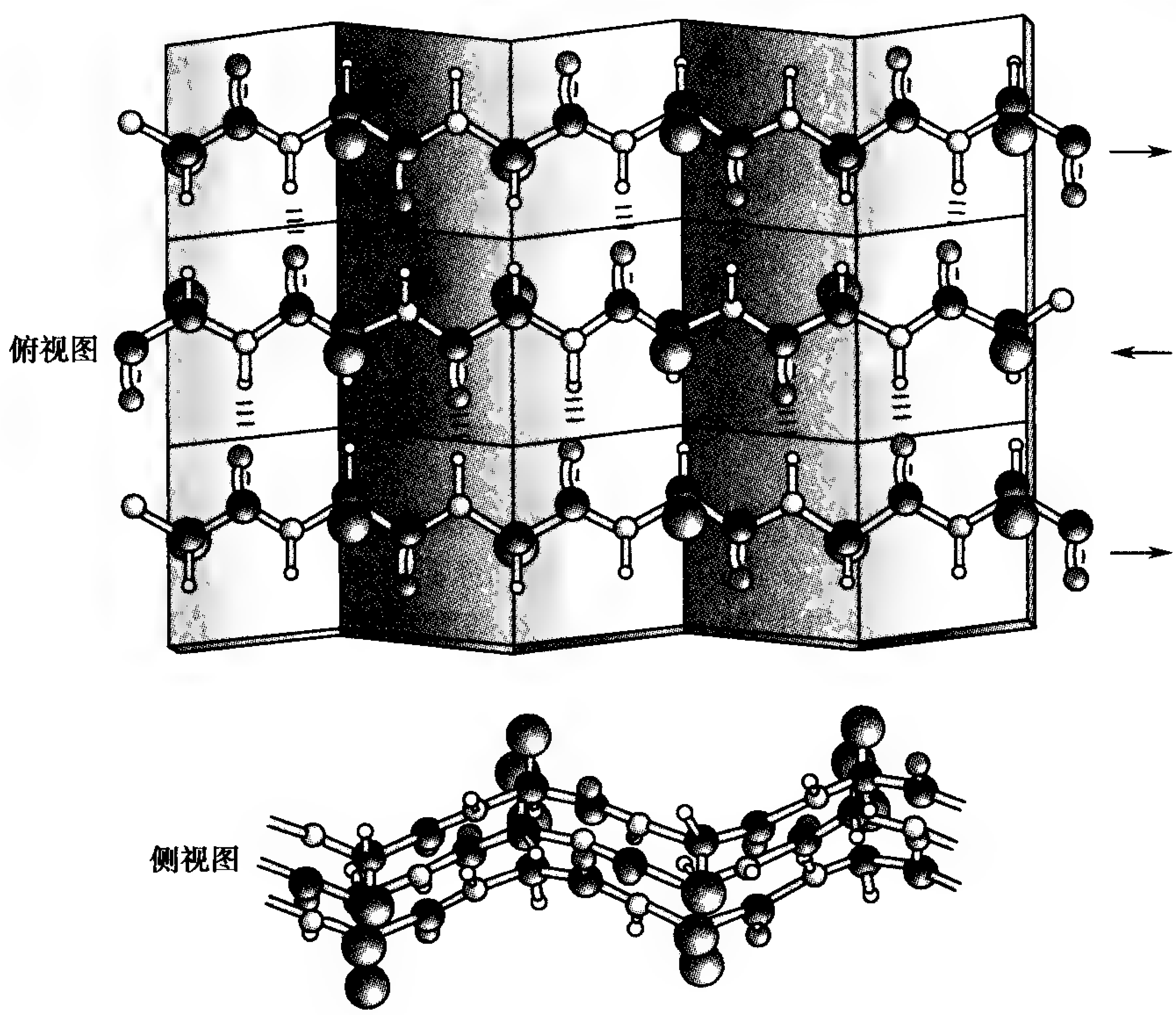
（三）β-折叠使多肽链形成片层结构

β-折叠与 α-螺旋的形状截然不同，呈折纸状。在 β 折叠结构（图 1-11）中，多肽链充分伸展，每个肽单元以 C_α 为旋转点，依次折叠成锯齿状结构，氨基酸残基侧链交替地位于锯齿状结构的上下方。所形成的锯齿状结构一般比较短，只含 5～8 个氨基酸残基，但两条以上肽链或一条肽链内的若干肽段的锯齿状结构可平行排列，两条肽链走向可相同，

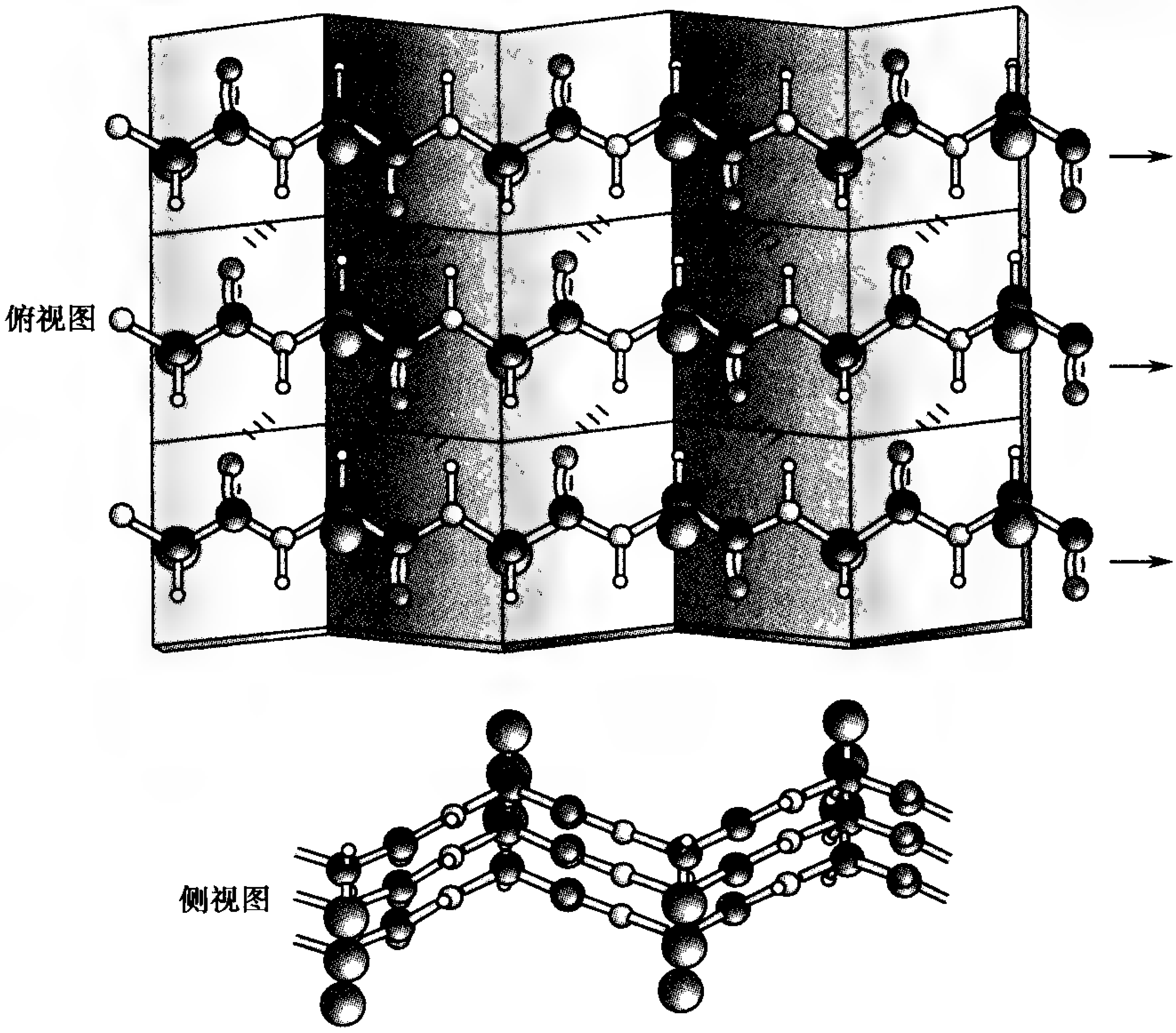
也可相反。走向相反时，两条反平行肽链的间距为 0.70nm（图 1-11a），并通过肽链间的肽键羰基氧和亚氨基氢形成氢键从而稳固 β-折叠结构，蚕丝蛋白几乎都是 β-折叠结构，许多蛋白质既有 α-螺旋又有 β-折叠结构。

L. Pauling 对蛋白质科学的贡献

L. Pauling 和 R. Corey 于 1951 年根据从小肽晶体结构中测得的多肽标准参数，预测出能够稳定存在的 α-螺旋结构，并得到实验证实。他们认识到氢键在极性基团，如肽键中的 C═O 和 N—H 的空间走向上很重要，同时注意到 20 世纪 30 年代 W. Astbury 研究蛋白质 X-射线衍射的先驱实验结果，即构成头发的纤维状蛋白——α-角蛋白是由有规则的结构组成，每 0.515～0.52nm 重复一次。Pauling 和 Corey 根据此信息以及他们关于肽键的数据和精确的结构模型，开始了真实蛋白质构象的工作。从而 Pauling 和 Corey 首先提出了符合肽键不转而其他各键可自由旋转的最简单的多肽链构象是螺旋结构，称之为 α-螺旋。Pauling 和 Corey 提出 α-角蛋白的两股链形成超螺旋的卷曲螺旋（coiled coil）结构。1946 年，Pauling 对于"在酶催化反应过渡态时，酶与底物处于最适的相互作用状态"作出详细的叙述；与此同时，Pauling 还提出了过渡态类似物（transition state analogs）的概念；相比底物而言，过渡态类似物能更紧密地与酶结合。这一理念现在广泛地被用于新药设计，如有效抗 HIV 药物——一种蛋白酶抑制剂，就是依据与 HIV 蛋白酶活性中心能紧密结合的过渡态类似物原理而设计的。基于 L. Pauling 对于蛋白质与酶的杰出贡献，于 1954 年获诺贝尔化学奖。



(a) 反平行



(b) 平行

●图 1-11 β-折叠

（四）β-转角和无规卷曲在蛋白质分子中普遍存在

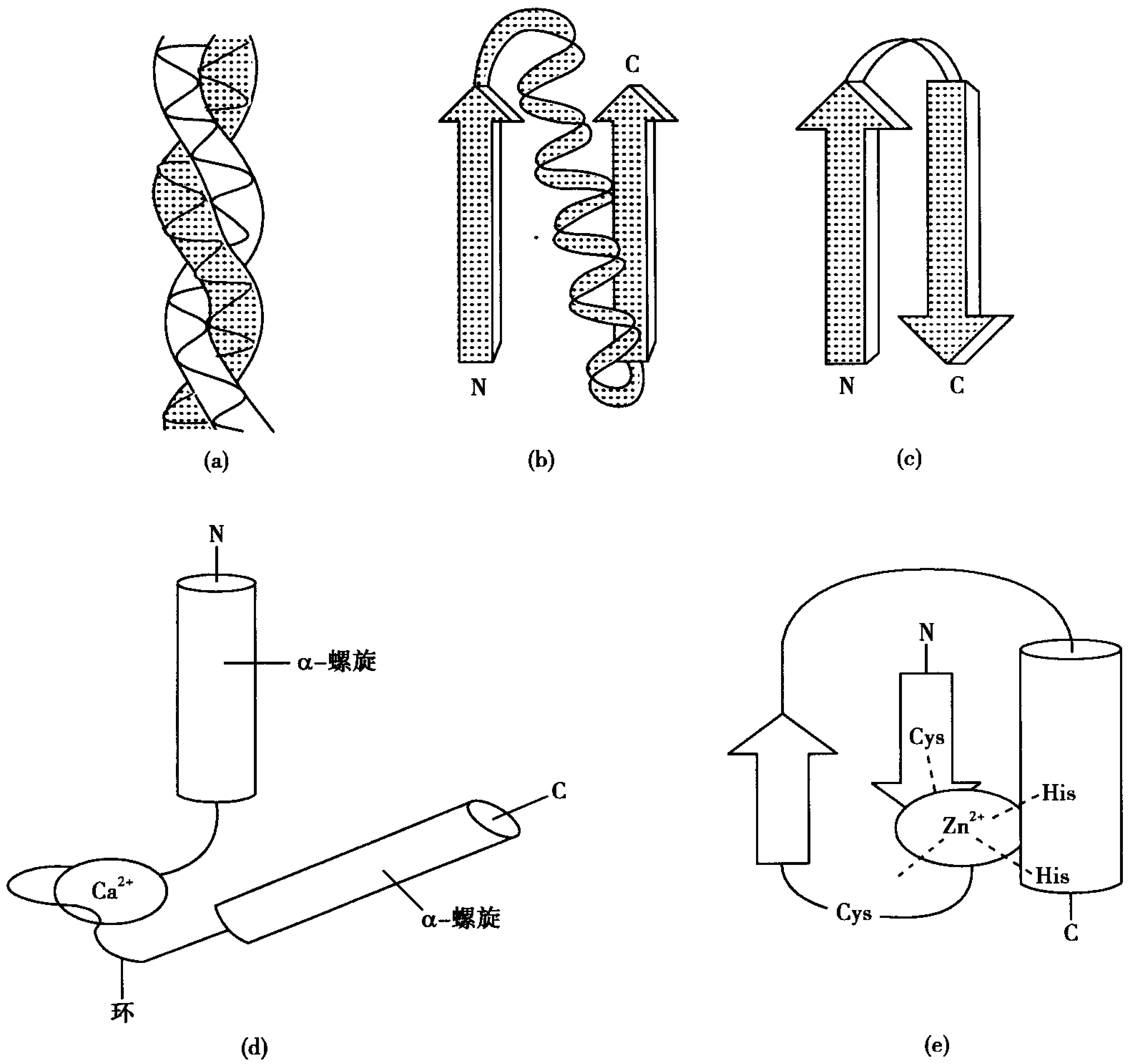
除 α-螺旋和 β-折叠外，蛋白质二级结构还包括 β-转角（β-turn）和无规卷曲（random coil）。β-转角常发生于肽链进行 180°回折时的转角上。β-转角通常由 4 个氨基酸残基组成，其第一个残基的羰基氧（O）与第四个残基的氨基氢（H）可形成氢键。β-转角的结构较特殊，第二个残基常为脯氨酸，其他常见残基有甘氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺和色氨酸。无规卷曲是用来阐述没有确定规律性的那部分肽链结构。

（五）模体是具有特殊功能的超二级结构

在许多蛋白质分子中，可发现两个或两个以上具有二级结构的肽段，在空间上相互接近，形成一个有规则的二级结构组合，被称为超二级结构，此概念由 M. G. Rossman 于 1973 年提出。目前已知的二级结构组合形式有 3 种：αα，βαβ，ββ（图 1-12）。研究 α-螺旋之间、β-折叠之间以及 α-螺旋与 β-折叠之间相互作用的规律发现，主要由非极性氨基酸残基参与此类相互作用。而模体（motif）是具有特殊功能的超二级结构，它是由两个或三个具有二级结构的肽段，在空间上相互接近，形成一个特殊的空间构象。一个模体总有其特征性的氨基酸序列，并发挥特殊的功能。一般而言，常见的模体可以有以下几种形式：α-螺旋-β 转角（或环）α 螺旋模体（常见于多种 DNA 结合蛋白质）；链-β 转角-链模体（常见于反平行 β-折叠的蛋白质）；链-β 转角-α-螺旋-β 转角-链模体（常见于多种 α-螺旋/β-折叠蛋白质）。在这些模体中，β 转角常为含 3～4 个氨基酸的片段；而环（loop）为较大的片段，常连接非规则的二级结构。

在许多钙结合蛋白分子中通常有一个结合钙离子的模体，它由 α-螺旋-环-α-螺旋三个肽段组成（图 1-12a），在环中有几个恒定的亲水侧链，侧链末端的氧原子通过氢键而结合钙离子。近年发现的锌指结构（zinc finger）也是一个常见的模体例子。此模体由一个 α-

螺旋和两个反平行的β折叠三个肽段组成（图 1-12b）。它形似手指，具有结合锌离子功能。此模体的 N 端有一对半胱氨酸残基，C-端有一对组氨酸残基，此四个残基在空间上形成一个洞穴，恰好容纳一个 Zn^{2+}。由于 Zn^{2+} 可稳固模体中 α-螺旋结构，致使此 α 螺旋能镶嵌于 DNA 的大沟中，因此含锌指结构的蛋白质都能与 DNA 或 RNA 结合。可见模体的特征性空间构象是其特殊功能的结构基础。有些蛋白质的模体仅有几个氨基酸残基组成，例如纤连蛋白中能与其受体结合的肽段，只是 RGD 三肽。



● 图 1-12 超二级结构与蛋白质模体

（a）、（b）、（c）分别是 αα、βαβ、ββ 超二级结构；（d）为钙结合蛋白中的结合钙离子的模体；（e）为锌指结构

（六）氨基酸残基的侧链对二级结构形成的影响

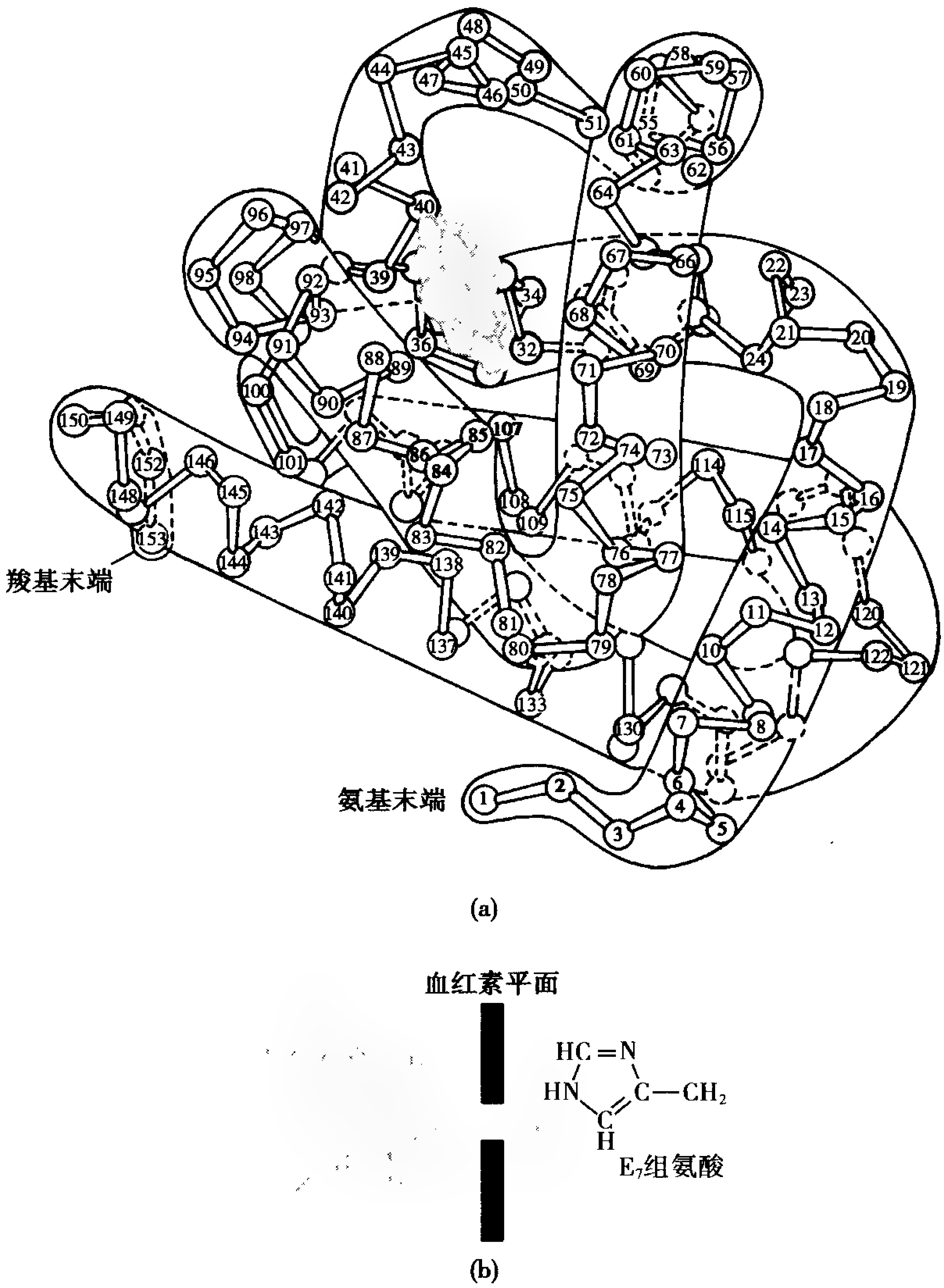
蛋白质二级结构是以一级结构为基础的。一段肽链其氨基酸残基的侧链适合形成 α-螺旋或 β-折叠，它就会出现相应的二级结构。例如一段肽链有多个谷氨酸或天冬氨酸残基相邻，则在 pH 7.0 时这些残基的游离羧基都带负电荷，彼此相斥，妨碍 α-螺旋的形成。同样，多个碱性氨基酸残基在一肽段内，由于正电荷相斥，也妨碍 α-螺旋的形成。此外天冬酰胺、亮氨酸的侧链较大，也会影响 α 螺旋形成；脯氨酸的 N 原子在刚性的五元环中，其形成的肽键 N 原子上没有 H，所以不能形成氢键，结果肽链走向转折，不形成 α-螺旋。形成 β-折叠的肽段要求氨基酸残基的侧链较小，才能容许两条肽段彼此靠近。

三、在二级结构基础上多肽链进一步折叠形成蛋白质三级结构

(一) 三级结构是指整条肽链中全部氨基酸残基的相对空间位置

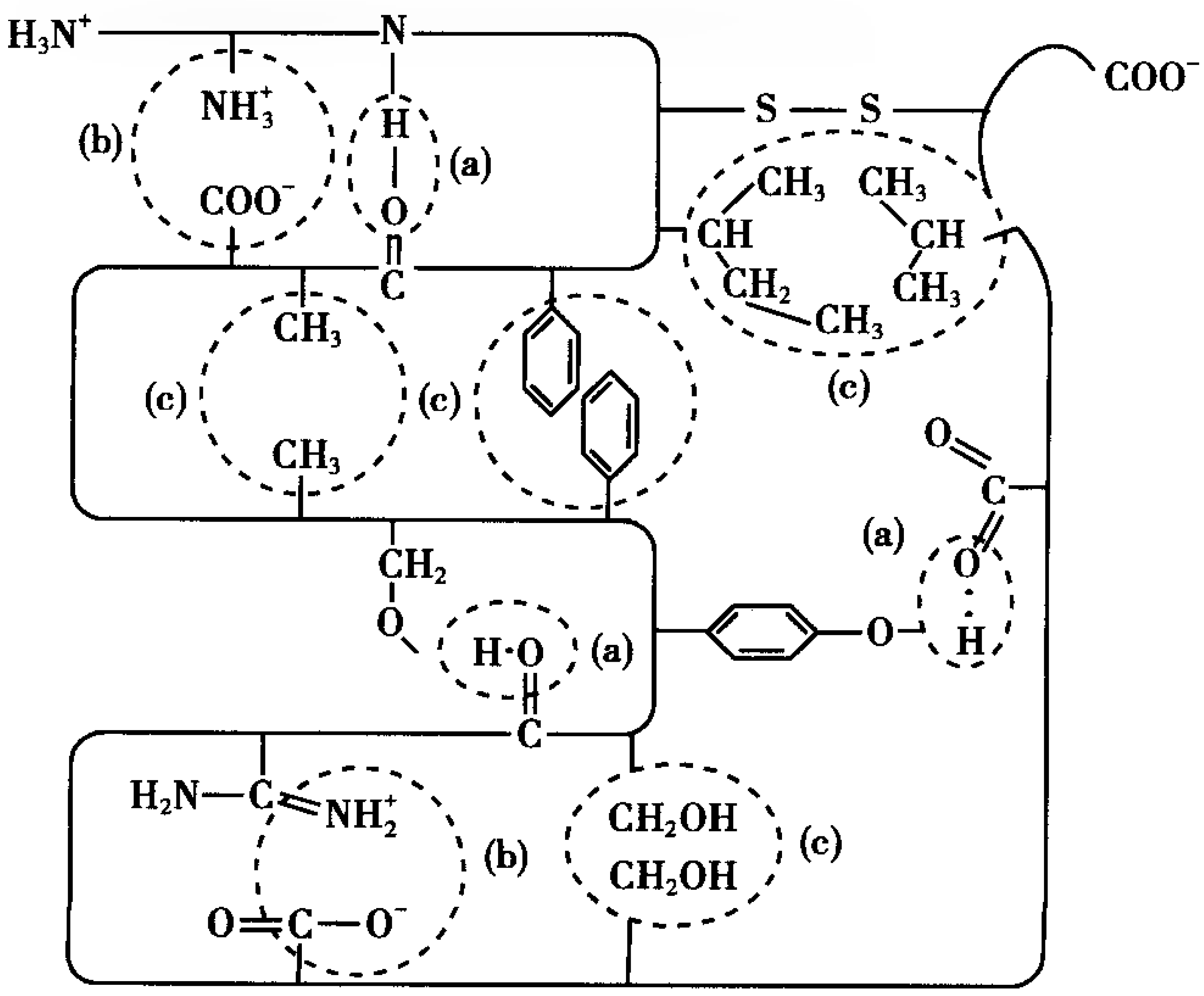
蛋白质的三级结构（tertiary structure）是指整条肽链中全部氨基酸残基的相对空间位置，也就是整条肽链所有原子在三维空间的排布位置。已知球状蛋白质的三级结构有某些共同特征，如球状蛋白质折叠成紧密的球状或椭球状；含有多种二级结构并具有明显的折叠层次，即一级结构上相邻的二级结构常在三级结构中彼此靠近并形成超二级结构，进一步折叠成相对独立的三维空间结构；疏水侧链常分布在分子内部等。

肌红蛋白是由 153 个氨基酸残基构成的单个肽链的蛋白质，含有 1 个血红素辅基。图 1-13 显示肌红蛋白的三级结构。肌红蛋白分子中 α-螺旋占 75%，构成 A 至 H 8 个螺旋区，两个螺旋区之间有一段无规卷曲，脯氨酸位于转角处。由于侧链 R 基团的相互作用，多肽链缠绕，形成一个球状分子（4.5mm×3.5mm×2.5mm），球表面主要有亲水侧链，疏



● 图 1-13　肌红蛋白中血红素与肽链的关系

（a）肌红蛋白；（b）结合氧示意图



● 图 1-14 维持蛋白质分子构象的各种化学键
（a）氢键；（b）离子键；（c）疏水作用

水侧链则位于分子内部。蛋白质三级结构的形成和稳定主要靠次级键，如疏水键、盐键、氢键和 Van der Waals 力等（图 1-14）。

（二）结构域是三级结构层次上的局部折叠区

分子量较大的蛋白质常可折叠成多个结构较为紧密的区域，并各行其功能，称为结构域（domain）。大多数结构域含有序列上连续的 100～200 个氨基酸残基，若用限制性蛋白酶水解，含多个结构域的蛋白质常分成数个结构域，但各结构域的构象基本不改变。因此，结构域也可看作是球状蛋白质的独立折叠单位，有较为独立的三维结构。

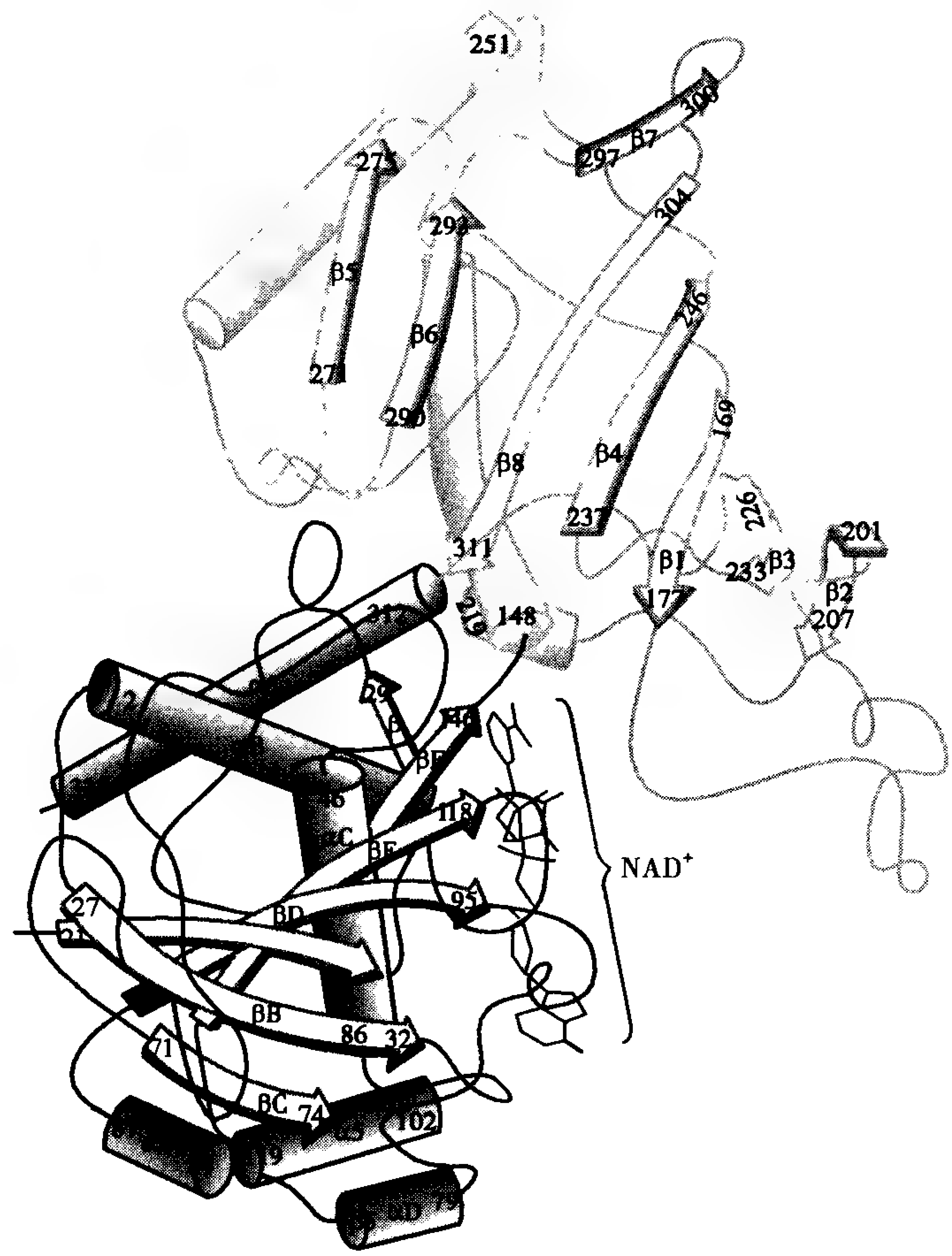
例如，由两个亚基构成的 3-磷酸甘油醛脱氢酶，每个亚基由两个结构域组成，N-端第 1～146 个氨基酸残基形成的第一个结构域能与 NAD^+ 结合，第二个结构域（第 147～333 氨基酸残基）能与底物 3-磷酸甘油醛结合（图 1-15）。有些蛋白质各结构域之间接触较多并紧密，从结构上很难划分，因此并非所有蛋白质的结构域都明显可分。

（三）分子伴侣参与蛋白质折叠

除一级结构为决定因素外，蛋白质空间构象的正确形成还需要一类称为分子伴侣（chaperon）的蛋白质参与。分子伴侣通过提供一个保护环境从而加速蛋白质折叠成天然构象或形成四级结构。许多分子伴侣是 ATP 酶，与未折叠的多肽结合后，能提供水解 ATP 产生的自由能，使多肽折叠成合适的构象时释放。

分子伴侣参与蛋白质折叠的作用机制正在不断被认识。蛋白质在合成时，还未折叠的肽段有许多疏水基团暴露在外，具有分子内或分子间聚集的倾向，使蛋白质不能形成正确空间构象。分子伴侣可逆地与未折叠肽段的疏水部分结合随后松开，如此重复进行可防止错误的聚集发生，使肽链正确折叠。分子伴侣也可与错误聚集的肽段结合，使之解聚后，再诱导其正确折叠。此外，蛋白质分子中特定位置二硫键的形成，是产生正确空间构象和发挥功能的必要条件。已经发现有些分子伴侣具有形成二硫键的酶活性，在蛋白质分子折叠过程中对二硫键正确形成起到重要的作用。

目前参与蛋白质折叠的分子伴侣可分为 3 类：①热休克蛋白 70（Hsp70）；②伴侣蛋白（chaperonin）；③核质蛋白（nucleoplasmin）。Hsp70 在真核和原核生物中都是高度保守的蛋白质，它可部分逆转变性或聚集的蛋白质。伴侣蛋白普遍存在于细菌、线粒体、叶绿体和真核生物，主要有 2 个家族：Hsp60（在大肠杆菌中又称为 GroEL）和 Hsp10。GroEL 含有 14 个亚基（60kD），每 7 个亚基形成一个环，2 个环重叠而成，环中心容纳一个 90kD 的球蛋白（GroES）（见第 12 章）。GroEL、GroES 和 14 个 ADP 结合在一起，未折叠的多肽进入 GroEL 分子中心并释放 GroES 和 14 个 ADP 分子；然后 GroEL 与 14 分子 ATP 结合，并减弱 GroEL 与未折叠多肽之间的相互作用，从而使 GroES 结合于 GroEL 另一端；14 分子 ATP 同时水解并释放出多肽，在此过程中多肽被折叠。如果多肽不能折叠成完全的天然构象，仍与 GroEL 结合，进入第二次循环。



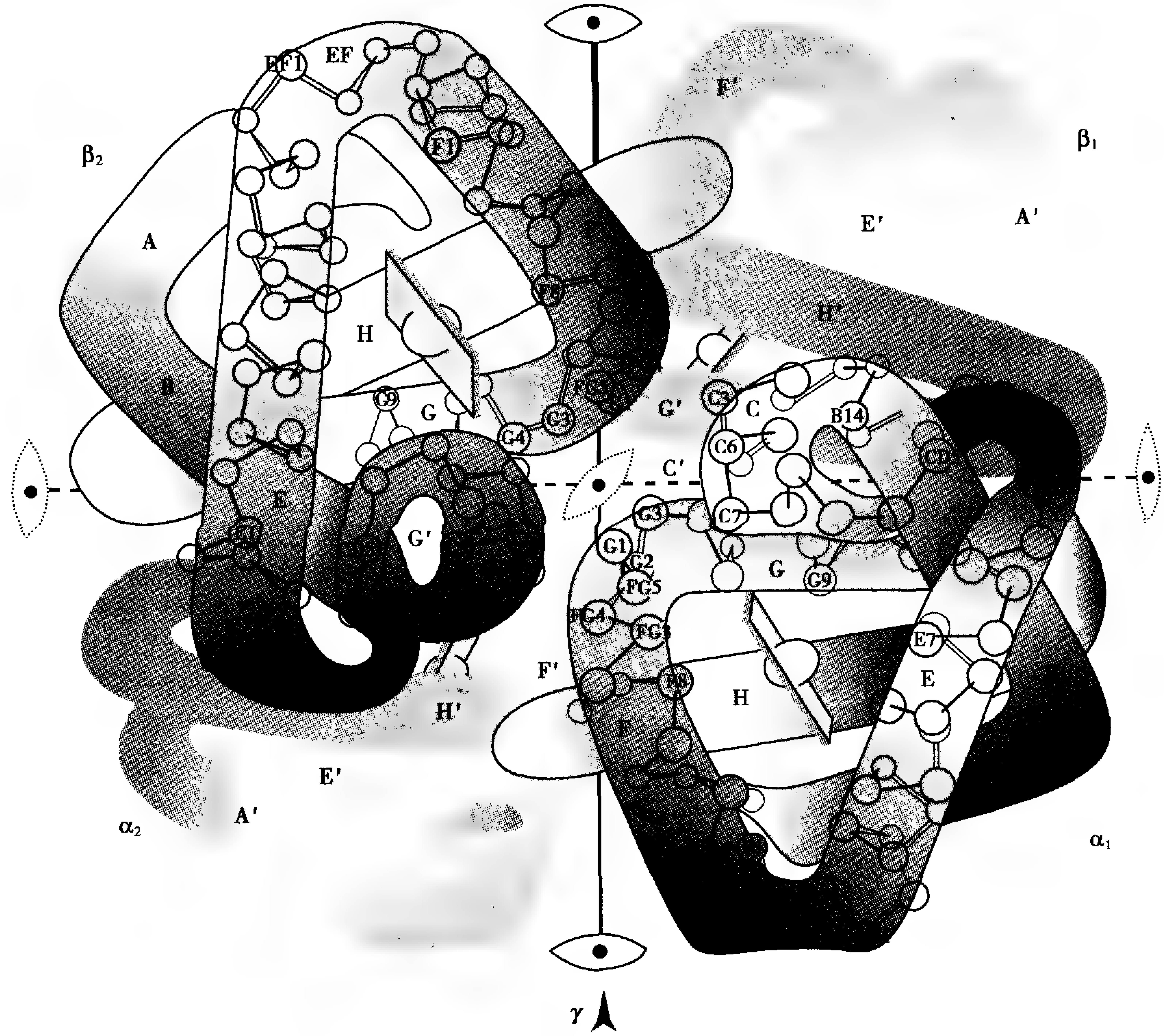
●图 1-15 3-磷酸甘油醛脱氢酶亚基的结构示意图

四、含有两条以上多肽链的蛋白质具有四级结构

在体内有许多蛋白质含有 2 条或 2 条以上多肽链，才能全面地执行功能。每一条多肽链都有其完整的三级结构，称为亚基（subunit），亚基与亚基之间呈特定的三维空间排布，并以非共价键相连接，这种蛋白质分子中各个亚基的空间排布及亚基接触部位的布局和相互作用，称为蛋白质的四级结构（quaternary structure）。

在四级结构中，各亚基间的结合力主要是氢键和离子键。由 2 个亚基组成的蛋白质四级结构中，若亚基分子结构相同，称之为同二聚体（homodimer），若亚基分子结构不同，则称之为异二聚体（heterodimer）。含有四级结构的蛋白质，单独的亚基一般没有生物学功能，只有完整的四级结构寡聚体才有生物学功能。

血红蛋白是由 2 个 α 亚基和 2 个 β 亚基组成的四聚体，α 亚基和 β 亚基分别含有 141 个和 146 个氨基酸。两种亚基的三级结构颇为相似，且每个亚基都可结合一个血红素（heme）辅基（图 1-16）。4 个亚基通过 8 个离子键相连，形成血红蛋白的四聚体，具有运输 O_2 和 CO_2 的功能。但每一个亚基单独存在时，虽可结合氧且与氧亲和力增强，但在体内组织中难于释放氧，失去了血红蛋白原有的运输氧的作用。



● 图 1-16 蛋白质的四级结构——血红蛋白结构示意图

五、蛋白质的分类

除氨基酸外，某些蛋白质还含有其他非氨基酸组分。因此根据蛋白质组成成分可分成单纯蛋白质和结合蛋白质，前者只含氨基酸，而后者除蛋白质部分外，还含有非蛋白质部分，为蛋白质的生物活性或代谢所依赖。结合蛋白质中的非蛋白质部分被称为辅基，绝大部分辅基是通过共价键方式与蛋白质部分相连。构成蛋白质辅基的种类也很广，常见的有色素化合物、寡糖、脂类、磷酸、金属离子，甚至分子量较大的核酸。细胞色素 c 是含有色素的结合蛋白质，其铁卟啉环上的乙烯基侧链与蛋白质部分的半胱氨酸残基以硫醚键相连，铁卟啉中的铁离子是细胞色素 c 的重要功能位点。免疫球蛋白是一类糖蛋白，作为辅基的数支寡糖链通过共价键与蛋白质部分连接。

蛋白质还可根据其形状分为纤维状蛋白质和球状蛋白质两大类。一般来说，纤维状蛋白质形似纤维，其分子长轴的长度比短轴长 10 倍以上。纤维状蛋白质多数为结构蛋白质，较难溶于水，作为细胞坚实的支架或连接各细胞、组织和器官，如胶原蛋白、弹性蛋白、角蛋白等。大量存在于结缔组织中的胶原蛋白就是典型的纤维状蛋白质，其长轴为 300nm，而短轴仅为 1.5nm。球状蛋白质的形状近似于球形或椭球形，多数可溶于水，许多具有生理活性的蛋白质如酶、转运蛋白、蛋白质类激素、代谢调节蛋白质、基因表达调

节蛋白质及免疫球蛋白等都属于球状蛋白质。

六、蛋白质组学

(一) 蛋白质组学基本概念

随着人类基因组计划的初步完成，生命科学研究已进入了后基因组时代，主要研究目标为功能基因组学，包括转录组学（transcriptomics）、蛋白质组学（proteomics）等。蛋白质组学已是后基因组时代生命科学研究的核心内容之一。

目前广泛应用的高通量的基因芯片、基因表达序列分析技术，都是从 mRNA 水平来了解基因的表达并推测其可能的功能。由于 mRNA 水平研究仅能反映转录水平及其调控，并不能真实反映蛋白质表达水平，加之蛋白质翻译后修饰极为复杂，无法从 mRNA 水平推测，因此，蛋白质表达谱的研究应运而生。

蛋白质组（proteome）一词由 M. Wilkins 于 1995 年提出，源于蛋白质（protein）与基因组（genome）两个词的组合。蛋白质组是指一种细胞或一种生物所表达的全部蛋白质，即"一种基因组所表达的全套蛋白质"。

蛋白质组学以细胞内全部蛋白质的存在及其活动方式为研究对象，其研究内容从刚起步时的蛋白质表达谱研究，发展到目前的蛋白质翻译后修饰谱（磷酸化修饰、糖基化修饰、泛素化等），蛋白质亚细胞定位图、蛋白质-蛋白质相互作用图以及蛋白质组生物信息学及数据库等的研究。最终，蛋白质高级结构的解析，对于阐明蛋白质结构与功能关系也是至关重要的内容，但还未纳入蛋白质组学研究范围。

(二) 蛋白质组学研究技术平台

蛋白质组学的发展依赖于双相电泳技术的发展、质谱新技术的发明以及在蛋白质分析中的应用和蛋白质组信息学的兴起。与传统的单个蛋白质研究不同，蛋白质组学的研究通常是高通量，高效率的。采用高通量的技术路线，包括双相电泳技术、基质辅助激光解析飞行时间质谱技术（MALDI TOF）、电喷雾质谱技术（electrospray mass spectrometry，ES-MS）、液体层析质谱技术（LS/MS/MS）和蛋白质芯片（protein chip）等进行蛋白质组学的研究。

1. 双向电泳分离样品蛋白质 蛋白质样品中的不同类型的蛋白质可以通过双向电泳进行分离（见本章第五节）。电泳后对胶进行高灵敏度的染色如银染和荧光染色，可以分离得到数千种蛋白质。作比较蛋白质组学研究时，还可将待比较的两种蛋白质样品分别用不同的荧光染料（如 Cy_3 和 Cy_5）标记，然后两种蛋白质样品在一块胶上进行双向电泳的分离，最后通过两种不同波长的荧光扫描技术分析结果，可提高蛋白质分析的灵敏度、可比性和相同蛋白质的匹配率。

2. 蛋白质点的定位、切取 染色后的凝胶可以利用凝胶图像分析系统成像，对蛋白质点进行定量分析，对感兴趣的蛋白质点进行定位与切取。蛋白质点经酶切消化后，进行脱盐或浓缩处理。

3. 蛋白质点的质谱分析 通过点样系统将上述处理的蛋白质点样到特定的材料的表面（MALDI TOF），在质谱系统中进行分析，从而得到蛋白质的定性数据，这些数据与已有的数据库进行比较分析，获得蛋白质信息，也可用于构建数据库。

随着蛋白质组学研究的深入，对于蛋白质样品预处理、高丰度蛋白质去除、低丰度蛋白质高效分离与富集等技术颇受重视，并有若干新进展。

(三) 蛋白质组学研究的科学意义

蛋白质组的研究不仅能解析基因表达产物——蛋白质的表达与功能的全貌，为生命活动规

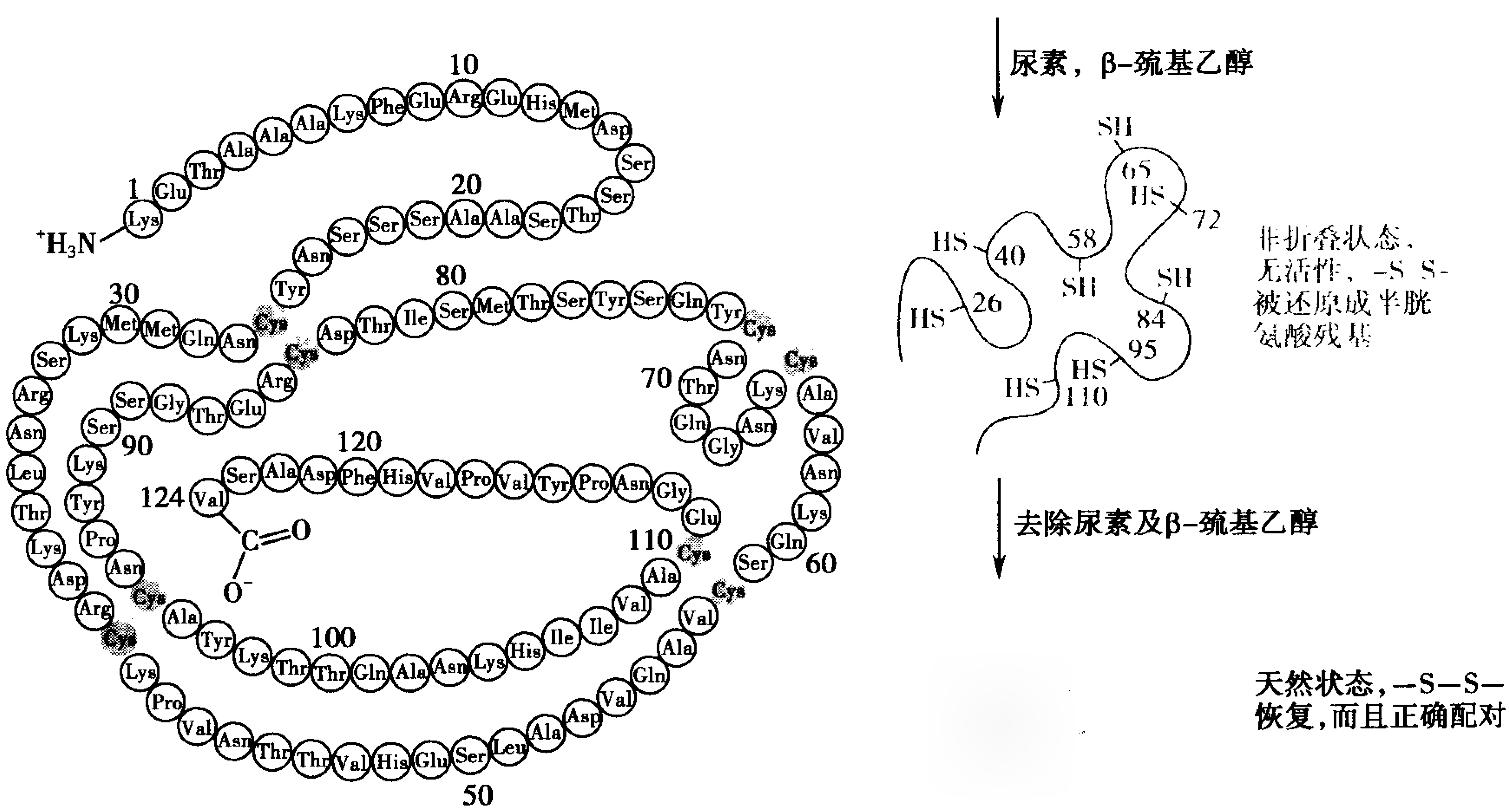
律提供物质基础，而且为多种疾病发生、发展机制的阐明及攻克提供理论根据和解决途径。近年来比较蛋白质组学不断发展，通过对正常个体及病理个体间的蛋白质组学比较分析，试图寻找与疾病相关的特异性蛋白质分子，以用作疾病早期诊断、预后观察的分子指标或成为新药物设计的分子靶点。如各种肿瘤的比较蛋白质组学研究，心血管疾病的比较蛋白质组学研究、各种感染性疾病的比较蛋白质组学研究都在积极开展中，也已取得了阶段性的成果。

第三节 蛋白质结构与功能的关系

一、蛋白质一级结构是高级结构与功能的基础

（一）一级结构是空间构象的基础

20 世纪 60 年代 Anfinsen 在研究核糖核酸酶时已发现，蛋白质的功能与其三级结构密切相关，而特定三级结构是以氨基酸顺序为基础的。核糖核酸酶由 124 个氨基酸残基组成，有 4 对二硫键（Cys26 和 Cys84，Cys40 和 Cys95，Cys58 和 Cys110，Cys65 和 Cys72）（图 1-17a）。用尿素（或盐酸胍）和 β-巯基乙醇处理该酶溶液，分别破坏次级键和二硫键，使其二、三级结构遭到破坏，但肽键不受影响，故一级结构仍存在，此时该酶活性丧失殆尽。核糖核酸酶中的 4 对二硫键被 β 巯基乙醇还原成 -SH 后，若要再形成 4 对二硫键，从理论上推算有 105 种不同的配对方式，唯有与天然核糖核酸酶完全相同的配对方式，才能呈现酶活性。当用透析方法去除尿素和 β-巯基乙醇后，松散的多肽链循其特定



(a) (b)

●图 1-17 牛核糖核酸酶一级结构与空间结构的关系

（a）牛核糖核酸酶的氨基酸序列；（b）β-巯基乙醇及尿素对核糖核酸酶的作用

的氨基酸序列，卷曲折叠成天然酶的空间构象，4 对二硫键也正确配对，这时酶活性又逐渐恢复至原来水平（图 1 17b）。这充分证明空间构象遭破坏的核糖核酸酶只要其一级结构（氨基酸序列）未被破坏，就可能恢复到原来的三级结构，功能依然存在。

（二）一级结构相似的蛋白质具有相似的高级结构与功能

蛋白质一级结构的比较，常被用来预测蛋白质之间结构与功能的相似性。同源性较高的蛋白质之间，可能具有相类似的功能。必须指出的是，蛋白质同源性（homology）是指由同一基因进化而来的一类蛋白质。已有大量的实验结果证明，一级结构相似的多肽或蛋白质，其空间构象和功能也相似。例如不同哺乳类动物的胰岛素分子结构都由 A 和 B 两条链组成，且二硫键的配对位置和空间构象也极相似，一级结构仅有个别氨基酸差异，因而它们都执行着相同的调节糖代谢等的生理功能（表 1 2）。

表 1-2 哺乳动物胰岛素氨基酸序列的差异

胰岛素	氨基酸残基序号			
	A5	A6	A10	A30
人	Thr	Ser	Ile	Thr
猪	Thr	Ser	Ile	Ala
狗	Thr	Ser	Ile	Ala
兔	Thr	Gly	Ile	Ser
牛	Ala	Gly	Val	Ala
羊	Ala	Ser	Val	Ala
马	Thr	Ser	Ile	Ala

A 表示 A 链，A5 表示 A 链第 5 位氨基酸，其余类推

（三）氨基酸序列提供重要的生物进化信息

一些广泛存在于生物界不同种系间的蛋白质，比较它们的一级结构，可以帮助了解物种进化间的关系。如细胞色素 c（cytochrome c），物种间越接近，则一级结构越相似，其空间构象和功能也越相似（图 1 18）。猕猴与人类很接近，两者一级结构只相差 1 个氨基酸残基，即第 102 位氨基酸猕猴为精氨酸，人类为酪氨酸；人类和黑猩猩的细胞色素 c 一级结构完全相同。面包酵母与人类从物种进化看，两者相差极远，所以两者细胞色素 c 一级结构相差达 51 个氨基酸。灰鲸是哺乳类动物，由陆上动物演化，它与猪、牛及羊只差 2 个氨基酸。

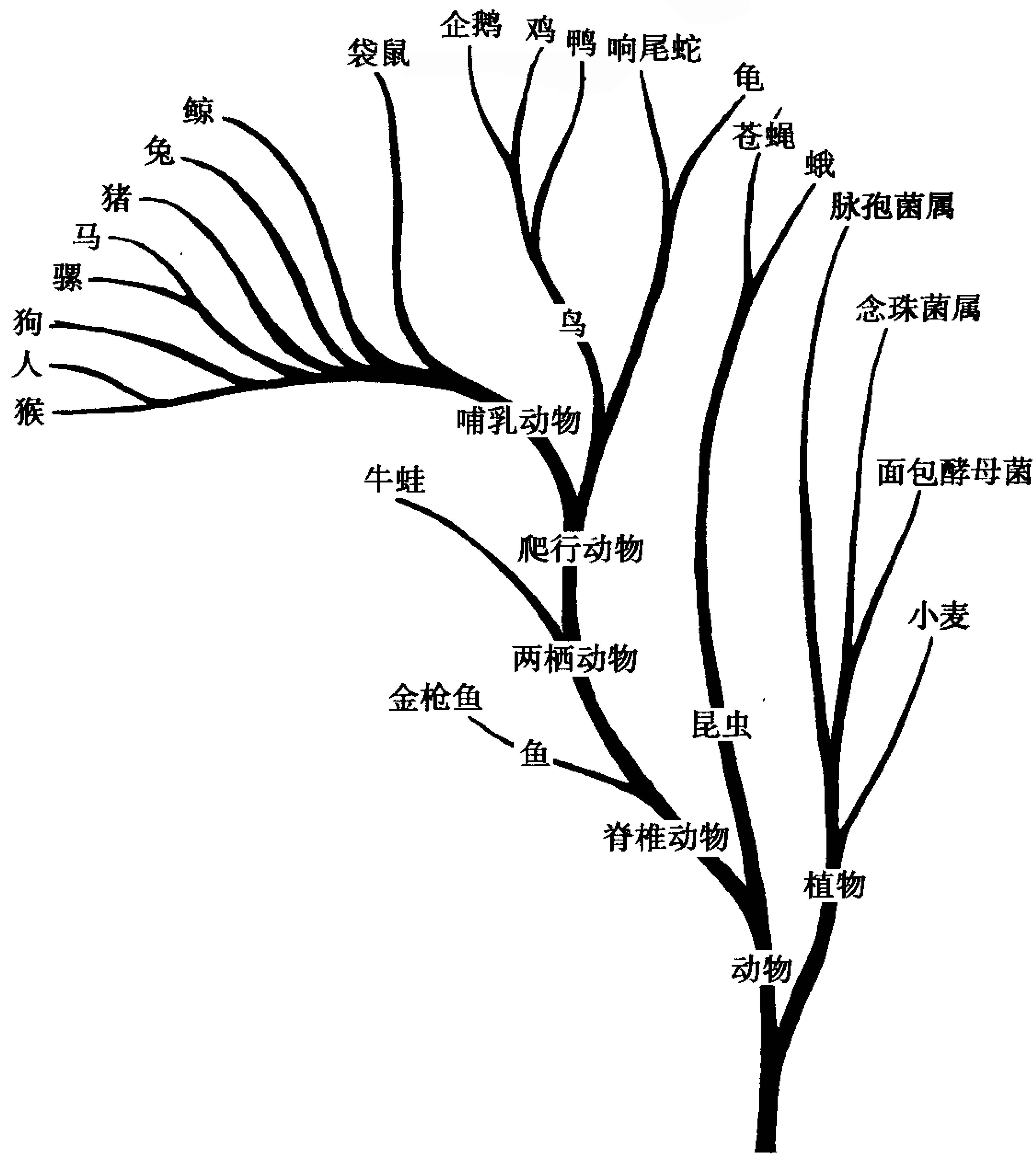
（四）重要蛋白质的氨基酸序列改变可引起疾病

蛋白质分子中起关键作用的氨基酸残基缺失或被替代，都会严重影响空间构象乃至生理功能，甚至导致疾病产生。例如正常人血红蛋白 β 亚基的第 6 位氨基酸是谷氨酸，而镰刀形贫血患者的血红蛋白中，谷氨酸变成了缬氨酸，即酸性氨基酸被中性氨基酸替代，仅此一个氨基酸之差，原是水溶性的血红蛋白，就聚集成丝，相互黏着，导致红细胞变形成为镰刀状而极易破碎，产生贫血。这种蛋白质分子发生变异所导致的疾病，被称之为“分子病”，其病因为基因突变所致。

但并非一级结构中的每个氨基酸都很重要，如细胞色素 c，这个蛋白质分子在某些位点即使置换数十个氨基酸残基，其功能依然不变。

二、蛋白质的功能依赖特定空间结构

体内蛋白质所具有的特定空间构象都与其特殊的生理功能有着密切的关系。例如角蛋白含有大量 α-螺旋结构，与富含角蛋白（keratin）组织的坚韧性并富有弹性直接相关；而

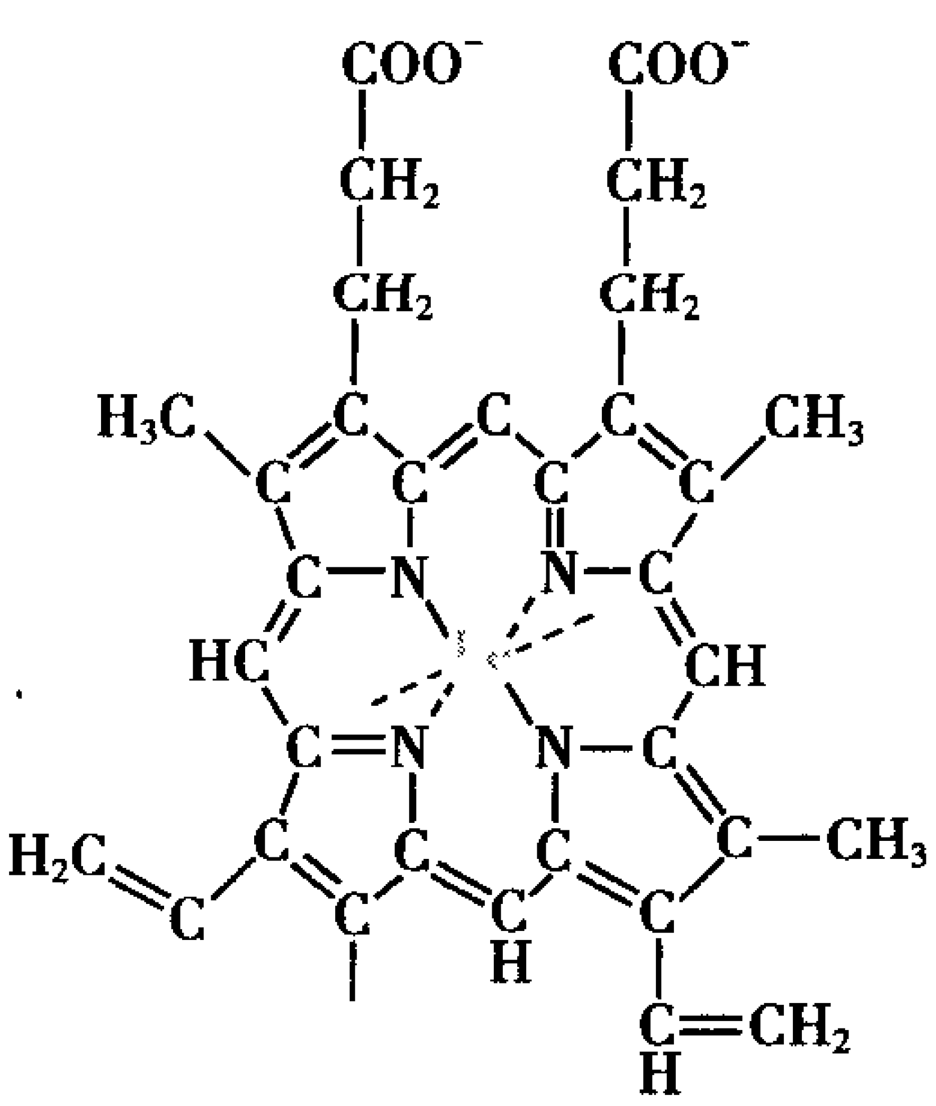


●图 1-18 从细胞色素 c 的一级结构看生物进化
物种进化过程中越接近的生物，它们的细胞色素 c 一级结构越近似

丝心蛋白分子中含有大量 β-折叠结构，致使蚕丝具有伸展和柔软的特性。以下以肌红蛋白和血红蛋白为例，阐述蛋白质空间结构和功能的关系。

(一) 血红蛋白亚基与肌红蛋白结构相似

肌红蛋白（myoglobin，Mb）与血红蛋白都是含有血红素辅基的蛋白质。血红素是铁卟啉化合物（图 1-19），它由 4 个吡咯环通过 4 个甲炔基相连成为一个环形，Fe^{2+} 居于环中。Fe^{2+} 有 6 个配位键，其中 4 个与吡咯环的 N 配位结合，1 个配位键和肌红蛋白的 93 位（F8）组氨酸残基结合，氧则与 Fe^{2+} 形成第 6 个配位键，接近第 64 位（E7）组氨酸。

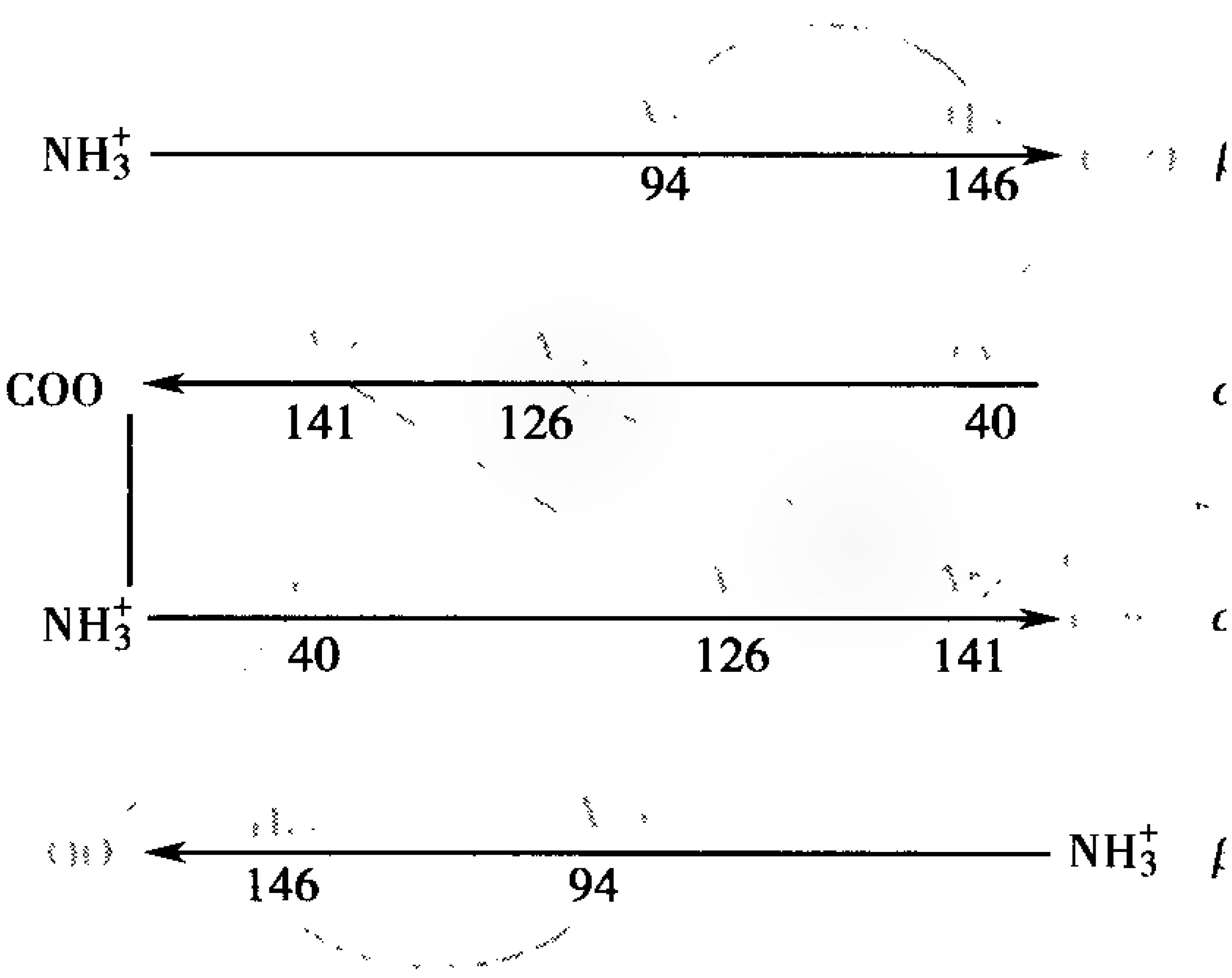


●图 1-19 血红素结构

从 X 线衍射法分析获得的肌红蛋白的三维结构（图 1-13）中，可见它是一个只有三级结构的单链蛋白质，有 8 段 α-螺旋结构，分别称为 A、B、C、D、E、F、G 及 H 肽段。整条多肽链折叠成紧密球状分子，氨基酸残基上的疏水侧链大都在分子内部，富极性及电荷的侧链则在分子表面，因此其水溶性较好。Mb 分子内部有一个袋形空穴，血红素居于其中。血红素分子中的两个丙酸侧链以离子键形式与肽链中的两个碱性氨基酸侧链上的正电荷相连，加之肽链中的 F8 组氨酸残基还与 Fe^{2+} 配位结合，所以血红素辅基与蛋白质部分稳定结合。

血红蛋白（hemoglobin，Hb）具有四个亚基组成的四级结构（图 1-16），每个亚基结构中间有一个疏水局部，可结合 1 个血红素并携带 1 分子氧，因此一分子 Hb 共结合 4 分子氧。成年人红细胞中的 Hb 主要由两条 α 肽链和两条 β 肽链（$\alpha_2\beta_2$）

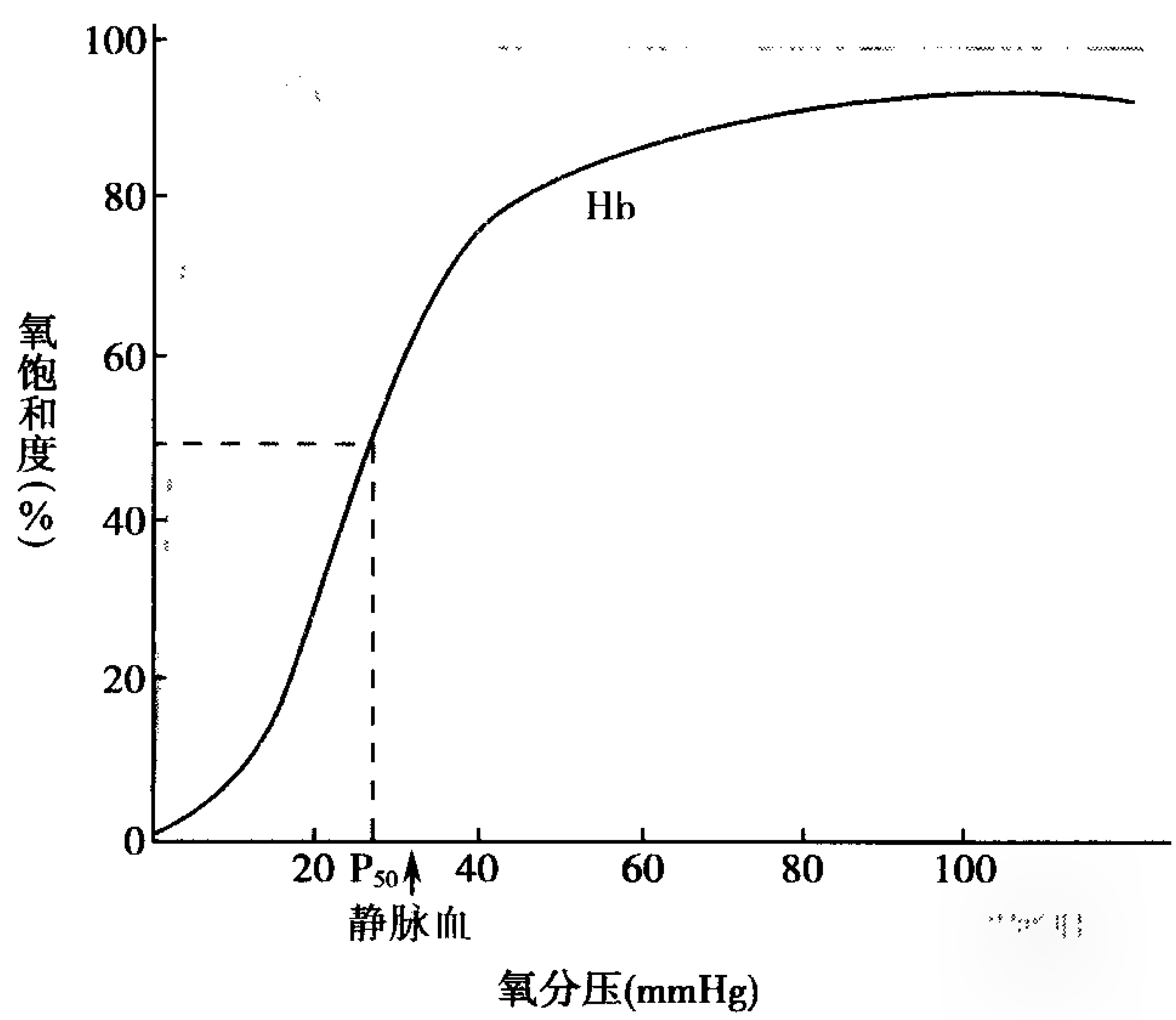
组成，α链含141个氨基酸残基，β链含146个氨基酸残基。胎儿期主要为$\alpha_2\gamma_2$，胚胎期为$\alpha_2\varepsilon_2$。Hb各亚基的三级结构与Mb极为相似。Hb亚基之间通过8对盐键（图1-20），使四个亚基紧密结合而形成亲水的球状蛋白。



●图1-20 脱氧Hb亚基间和亚基内的盐键

（二）血红蛋白亚基构象变化可影响亚基与氧结合

Hb与Mb一样可逆地与O_2结合，氧合Hb占总Hb的百分数（称百分饱和度）随O_2浓度变化而变化。图1-21为Hb和Mb的氧解离曲线，前者为S状曲线，后者为直角双曲线。可见，Mb易与O_2结合，而Hb与O_2的结合在O_2分压较低时较难。Hb与O_2结合的S型曲线提示Hb的4个亚基与4个O_2结合时平衡常数并不相同，而是有4个不同的平衡常数。Hb最后一个亚基与O_2结合时其平衡常数最大，从S型曲线的后半部呈直线上升可证明此点。根据S形曲线的特征可知，Hb中第一个亚基与O_2结合以后，促进第二个及第三个亚基与O_2的结合，当前三个亚基与O_2结合后，又大大促进第四个亚基与O_2结合，这种效应称为正协同效应(positive cooperativity)。协同效应的定义是指一个亚基与其配体（Hb中的配体为O_2）结合后，能影响此寡聚体中另一亚基与配体的结合能力。如果是促进作用则称为正协同效应；反之则为负协同效应。

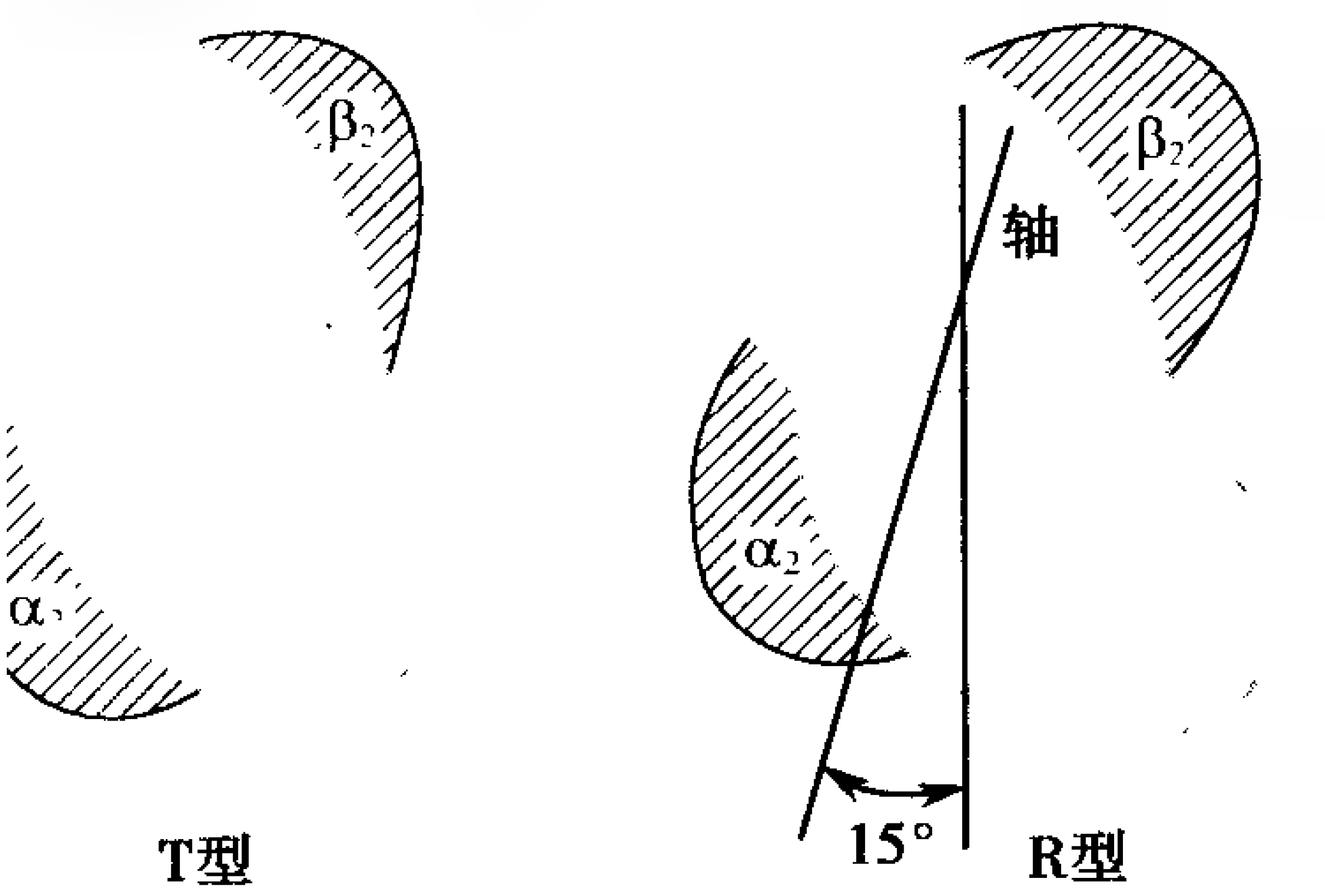


●图1-21 肌红蛋白（Mb）与血红蛋白（Hb）的氧解离曲线

（1mmHg=133.322Pa）

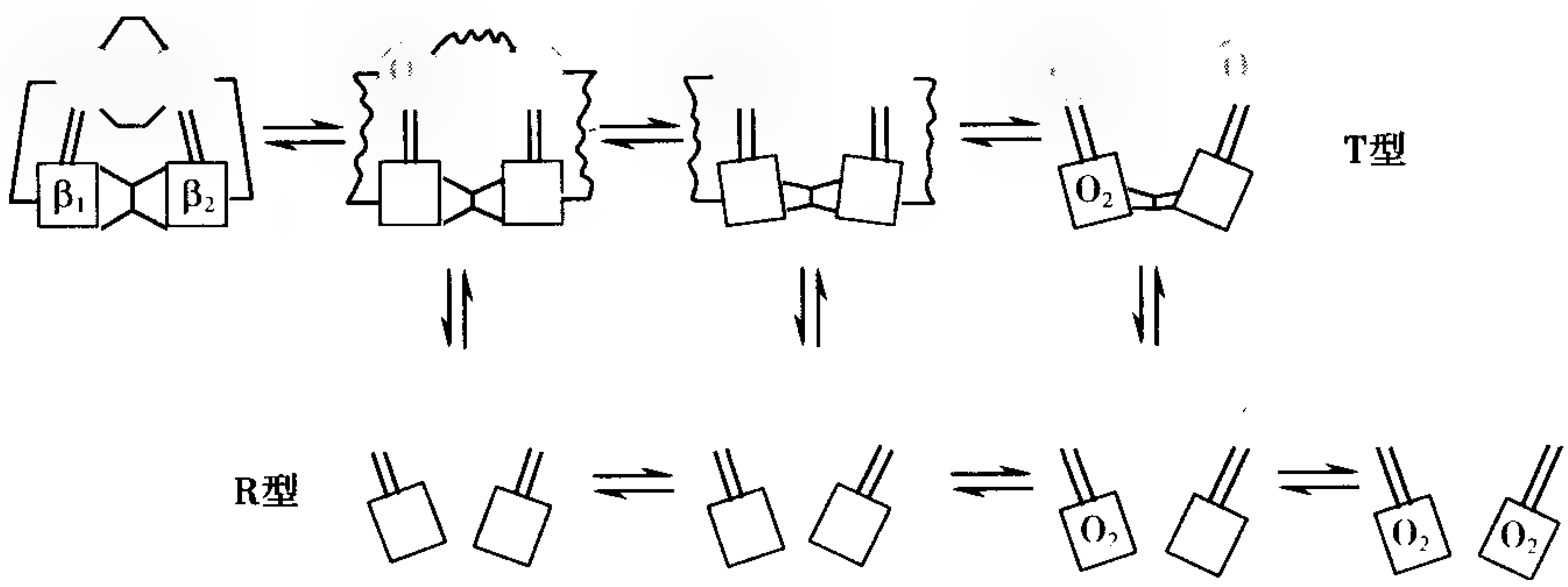
根据Perutz等利用X线衍射技术分析Hb和氧合Hb结晶的三维结构图谱，提出了解释O_2与Hb结合的正协同效应的理论。

未结合O_2时，Hb的α_1/β_1和α_2/β_2呈对角排列，结构较为紧密，称为紧张态（tense state，T态），T态Hb与O_2的亲和力小。随着O_2的结合，4个亚基羧基末端之间的盐键(图1-22)断裂，其二级、三级和四级结构也发生变化，使α_1/β_1和α_2/β_2的长轴形成15°的夹角(图1-23)，结构显得相对松弛，称为松弛态(relaxed state，R态)。图1-23显示



●图 1-22　Hb T态与R态互变

Hb 氧合与脱氧时 T 态和 R 态相互转换的可能方式。T 态转变成 R 态是逐个结合 O_2 而完成的。在脱氧 Hb 中，Fe^{2+} 半径比卟啉环中间的孔大，因此 Fe^{2+} 高出卟啉环平面 0.075nm，而靠近 F8 位组氨酸残基。当第 1 个 O_2 与血红素 Fe^{2+} 结合后，使 Fe^{2+} 的半径变小，进入到卟啉环中间的小孔中（图 1-24），引起 F 肽段等一系列微小的移动，同时影响附近肽段的构象，造成两个 α 亚基间盐键断裂，使亚基间结合松弛，可促进第二个亚基与 O_2 结合，依此方式可影响第三、四个亚基与 O_2 结合，最后使四个亚基全处于 R 态。此种由一个氧分子与 Hb 亚基结合后引起亚基的构象变化，称为变构效应（allosteric effect）。小分子 O_2 称为变构剂或效应剂，Hb 则被称为变构蛋白。变构效应不仅发生在 Hb 与 O_2 之间，一些酶与变构剂的结合，配体与受体结合也存在着变构效应，所以它具有普遍的生物学意义。

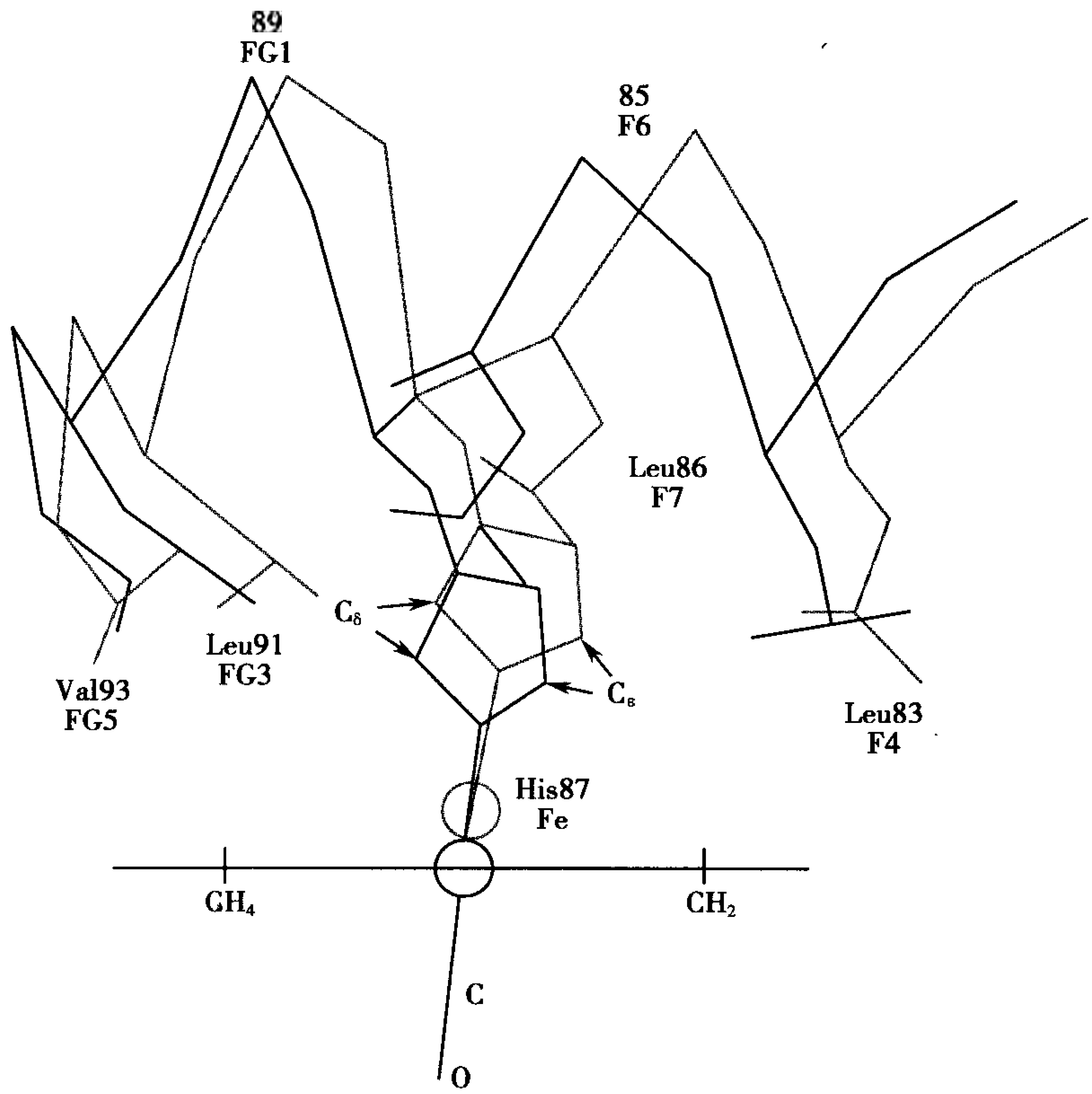


●图 1-23　Hb 氧合与脱氧构象转换示意图

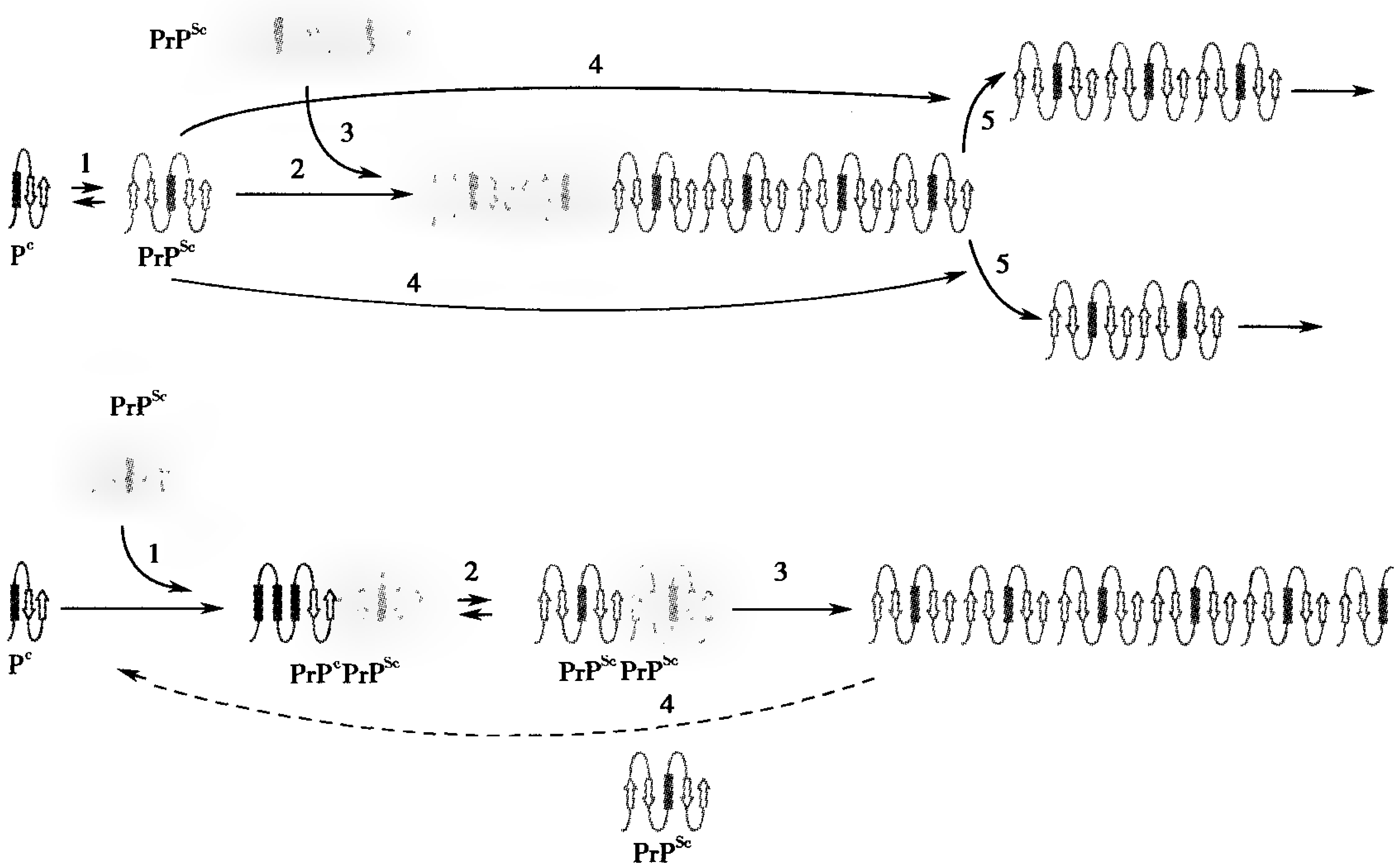
（三）蛋白质构象改变可引起疾病

生物体内蛋白质的合成、加工和成熟是一个复杂的过程，其中多肽链的正确折叠对其正确构象的形成和功能发挥至关重要。若蛋白质的折叠发生错误，尽管其一级结构不变，但蛋白质的构象发生改变，仍可影响其功能，严重时可导致疾病发生，有人将此类疾病称为蛋白构象疾病。有些蛋白质错折叠后相互聚集，常形成抗蛋白水解酶的淀粉样纤维沉淀，产生毒性而致病，表现为蛋白质淀粉样纤维沉淀的病理改变，这类疾病包括人纹状体脊髓变性病、老年痴呆症、亨廷顿舞蹈病（Huntington disease）和疯牛病等。

疯牛病是由朊病毒蛋白（prion protein，PrP）引起的一组人和动物神经的退行性病变，这类疾病具有传染性、遗传性或散在发病的特点，其在动物间的传播是由 PrP 组成的传染性颗粒（不含核酸）完成的。PrP 是染色体基因编码的蛋白质。正常动物和人的 PrP 为分子量 33～35kD 的蛋白质，其水溶性强、对蛋白酶敏感以及二级结构为多个 α 螺旋，称为 PrPC。富含 α-螺旋的 PrPC 在某种未知蛋白质的作用下可转变成全为 β 折叠的 PrP 致病分子，称为 PrPSc。但 PrPC 和 PrPSc 两者的一级结构完全相同。可见 PrPC 转变成 PrPSc 涉及蛋白质分子 α-螺旋重新排布成 β-折叠的过程。外源或新生的 PrPSc 可以作为模板，通过复杂的机制使仅含 α 螺旋的 PrPC 重新折叠成为仅含 β-折叠的 PrPSc（图 1-25）。PrPSc 对蛋白酶不敏感，水溶性差，而且对热稳定，可以相互聚集，最终形成淀粉样纤维沉淀而致病。



●图 1-24　血红素与 O_2 结合



●图 1-25　PrP^C转变成 PrP^{Sc}的过程

S. Prusiner提出没有核酸的传染源

1997年诺贝尔医学奖得主S. Prusiner，他的先驱工作是发现了一个全新的传染性疾病类型，并阐明了其发病的机制。S. Prusiner成功地将prions归类至已知的感染源如细菌、病毒、霉菌、寄生虫等中。S. Prusiner从事这一研究始于1972年，那年他的一个患有人纹状体脊髓变性病（Creutzfeldt-Jakob disease，CJD）病人因痴呆而死亡。当时，已知晓CJD，kuru患者或羊瘙痒症的病脑提取物能传染疾病，对其传染源性质推测，众说纷纭。而其中无核酸传染源的理论颇具挑战性。与传统的任何传染源都有遗传性物质——核酸的理论相悖。但S. Prusiner所做的所有实验，都证实传染源仅为单一的蛋白质，不含核酸。他继续接受挑战，进行了更精细的研究。10年后，于1982年Prusiner成功地从患病仓鼠脑中制备出了单一传染制剂，随后，所有实验结果都证实该传染源仅含一种蛋白质，S. Prusiner命名为prion，但这一结论遭到当时科学界的极度怀疑，而坚定的Prusiner继续其艰辛的工作，直至最终确证了这一新传染源的性质。Prusiner的新发现提供了极为重要的线索，为阐明其他类型的痴呆相关疾病，如Alzheimer病的生物学机制以及新药开发奠定了基础。

第四节　蛋白质的理化性质

蛋白质既然是由氨基酸组成，其理化性质必然有与氨基酸相同或相关的方面，例如，两性电离及等电点、紫外吸收性质、呈色反应等；但蛋白质又是生物大分子，具有氨基酸没有的理化性质。

一、蛋白质具有两性电离性质

蛋白质分子除两端的氨基和羧基可解离外，氨基酸残基侧链中某些基团，如谷氨酸、天冬氨酸残基中的γ和β-羧基，赖氨酸残基中的ε-氨基、精氨酸残基中的胍基和组氨酸残基中的咪唑基，在一定的溶液pH条件下都可解离成带负电荷或正电荷的基团。当蛋白质溶液处于某一pH时，蛋白质解离成正、负离子的趋势相等，即成为兼性离子，净电荷为零，此时溶液的pH称为蛋白质的等电点（isoelectric point，pI）。蛋白质溶液的pH大于等电点时，该蛋白质颗粒带负电荷，反之则带正电荷。

体内各种蛋白质的等电点不同，但大多数接近于pH5.0。所以在人体体液pH7.4的环境下，大多数蛋白质解离成阴离子。少数蛋白质含碱性氨基酸较多，其等电点偏于碱性，被称为碱性蛋白质，如鱼精蛋白、组蛋白等。也有少量蛋白质含酸性氨基酸较多，其等电点偏于酸性，被称为酸性蛋白质，如胃蛋白酶和丝蛋白等。

二、蛋白质具有胶体性质

蛋白质属于生物大分子之一，分子量可自1万～100万kD之巨，其分子的直径可达1～100nm，为胶粒范围之内。蛋白质颗粒表面大多为亲水基团，可吸引水分子，使颗粒表面形成一层水化膜，从而阻断蛋白质颗粒的相互聚集，防止溶液中蛋白质的沉淀析出。除水化膜是维持蛋白质胶体稳定的重要因素外，蛋白质胶粒表面可带有电荷，也可起胶粒

稳定的作用。若去除蛋白质胶体颗粒表面电荷和水化膜两个稳定因素，蛋白质极易从溶液中析出。

三、蛋白质空间结构破坏而引起变性

蛋白质的二级结构以氢键维系局部主链构象稳定；三、四级结构主要依赖于氨基酸残基侧链之间的相互作用，从而保持蛋白质的天然构象。但在某些物理和化学因素作用下，其特定的空间构象被破坏，即有序的空间结构变成无序的空间结构，从而导致其理化性质的改变和生物活性的丧失，称为蛋白质的变性（denaturation）。一般认为蛋白质的变性主要发生在二硫键和非共价键的破坏，不涉及一级结构中氨基酸序列的改变。蛋白质变性后，其理化性质及生物学性质发生改变，如溶解度降低，黏度增加，结晶能力消失，生物活性丧失，易被蛋白酶水解等。造成蛋白质变性的因素有多种，常见的有加热、乙醇等有机溶剂、强酸、强碱、重金属离子及生物碱试剂等。在临床医学上，变性因素常被应用来消毒及灭菌。此外，防止蛋白质变性也是有效保存蛋白质制剂（如疫苗等）的必要条件。

蛋白质变性后，疏水侧链暴露在外，肽链融汇相互缠绕继而聚集，因而从溶液中析出，这一现象被称为蛋白质沉淀。变性的蛋白质易于沉淀，有时蛋白质发生沉淀，但并不变性。

若蛋白质变性程度较轻，去除变性因素后，有些蛋白质仍可恢复或部分恢复其原有的构象和功能，称为复性（renaturation）。在核糖核酸酶溶液中加入尿素和β-巯基乙醇，可解除其分子中的4对二硫键和氢键，使空间构象遭到破坏，丧失生物活性。变性后如经透析方法去除尿素和β-巯基乙醇，并设法使巯基氧化成二硫键，核糖核酸酶又恢复其原有的构象，生物学活性也几乎全部重现。但是许多蛋白质变性后，空间构象严重被破坏，不能复原，称为不可逆性变性。

蛋白质经强酸、强碱作用发生变性后，仍能溶解于强酸或强碱溶液中，若将pH调至等电点，则变性蛋白质立即结成絮状的不溶解物，此絮状物仍可溶解于强酸和强碱中。如再加热则絮状物可变成比较坚固的凝块，此凝块不易再溶于强酸和强碱中，这种现象称为蛋白质的凝固作用（protein coagulation）。实际上凝固是蛋白质变性后进一步发展的不可逆的结果。

四、蛋白质在紫外光谱区有特征性吸收峰

由于蛋白质分子中含有共轭双键的酪氨酸和色氨酸，因此在280nm波长处有特征性吸收峰。在此波长范围内，蛋白质的 A_{280} 与其浓度呈正比关系，因此可作蛋白质的定量测定。

五、应用蛋白质呈色反应可测定蛋白质溶液含量

1. 茚三酮反应（ninhydrin reaction）　蛋白质经水解后产生的氨基酸也可发生茚三酮反应，详见本章第一节。

2. 双缩脲反应（biuret reaction）　蛋白质和多肽分子中肽键在稀碱溶液中与硫酸铜共热，呈现紫色或红色，称为双缩脲反应。氨基酸不出现此反应。当蛋白质溶液中蛋白质的水解不断加强时，氨基酸浓度上升，其双缩脲呈色的深度就逐渐下降，因此双缩脲反应可

检测蛋白质的水解程度。

第五节　蛋白质的分离、纯化与结构分析

蛋白质是生物大分子化合物，具有胶体性质、沉淀、变性和凝固等特点。在细胞和体液中常有数千种蛋白质相混合而存在，要分析单个类型蛋白质的结构和功能势必要先分离纯化单个蛋白质。蛋白质分离通常就是利用其特殊理化性能，采取透析、盐析、电泳、层析及超速离心等不损伤蛋白质空间构象的物理方法，以满足研究蛋白质结构与功能的需要。

一、透析及超滤法可去除蛋白质溶液中的小分子化合物

利用透析袋把大分子蛋白质与小分子化合物分开的方法叫透析（dialysis）。透析袋是用具有超小微孔的膜，如硝酸纤维素膜制成。微孔一般只允许分子量为 10kD 以下的化合物通过。高分子量的蛋白质即留在袋内。当透析袋内盛有蛋白质溶液，再置于水中，则小分子物质如硫酸铵、氯化钠等能透过薄膜。如果袋外放吸水剂如聚乙二醇，则袋内水分伴同小分子物质透出袋外，袋内蛋白质溶液还可达到浓缩的目的。同样，应用正压或离心力使蛋白质溶液透过有一定截留分子量的超滤膜，达到浓缩蛋白质溶液的目的，称为超滤法，此法简便且回收率高，是蛋白质溶液浓缩的常用方法。

二、丙酮沉淀、盐析及免疫沉淀是常用的蛋白质沉淀方法

这是常用的使蛋白质从溶液中沉淀的方法。蛋白质在溶液中一般含量很低，经沉淀浓缩，以便进一步分离纯化。使用丙酮沉淀时，必须在 0～4℃低温下进行，丙酮用量一般 10 倍于蛋白质溶液体积。蛋白质被丙酮沉淀后，应立即分离，否则蛋白质会变性。除了用丙酮以外，也可用乙醇沉淀。

盐析（salt precipitation）是将硫酸铵、硫酸钠或氯化钠等加入蛋白质溶液，使蛋白质表面电荷被中和且水化膜被破坏，导致蛋白质在水溶液中的稳定性因素去除而沉淀。各种蛋白质盐析时所需的盐浓度及 pH 均不同。例如血清中的白蛋白及球蛋白，前者溶于 pH7.0 左右的半饱和的硫酸铵溶液中，而后者在此溶液中沉淀。当硫酸铵溶液达到饱和时，白蛋白也随之析出。所以盐析法可将蛋白质初步分离，但欲得纯品，尚需用其他方法。许多蛋白质经纯化后，在盐溶液中长期放置逐渐析出，成为整齐的结晶。

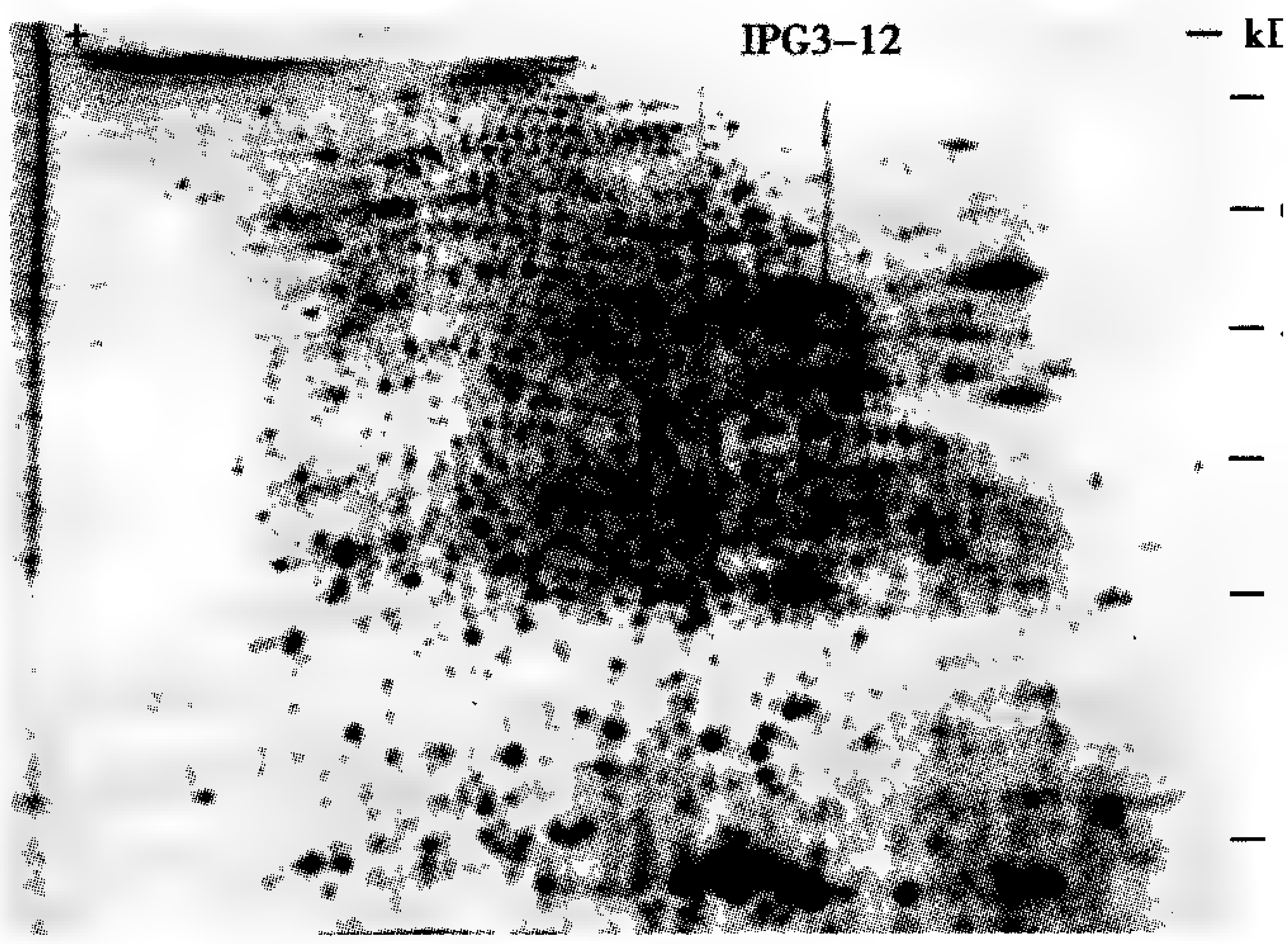
蛋白质具有抗原性，将某一纯化蛋白质免疫动物可获得抗该蛋白的特异抗体。利用特异抗体识别相应的抗原蛋白，并形成抗原抗体复合物的性质，可从蛋白质混合溶液中分离获得抗原蛋白，这就是免疫沉淀法。在具体实验中，常将抗体交联至固相化的琼脂糖珠上，易于获得抗原抗体复合物。进一步将抗原抗体复合物溶于含十二烷基磺酸钠和二巯基丙醇的缓冲液后加热，使抗原从抗原抗体复合物中分离而获得纯化。

三、利用荷电性质可用电泳法将蛋白质分离

蛋白质在高于或低于其 pI 的溶液中为带电的颗粒，在电场中能向正极或负极移动。这种通过蛋白质在电场中泳动而达到分离各种蛋白质的技术，称为电泳（electrophore-

sis)。根据支撑物的不同，有薄膜电泳、凝胶电泳等。薄膜电泳是将蛋白质溶液点样于薄膜上，薄膜两端分别加正负电极，此时带正电荷的蛋白质向负极泳动；带负电荷的蛋白质向正极泳动；带电多，分子量小的蛋白质泳动速率快；带电少，分子量大的蛋白质则泳动慢，于是蛋白质被分离。凝胶电泳的支撑物为琼脂糖、淀粉或聚丙烯酰胺凝胶。凝胶置于玻璃板上或玻璃管中，凝胶两端分别加上正、负电极，蛋白质即在凝胶中泳动。电泳结束后，用蛋白质显色剂显色，即可看到一条条已被分离的蛋白质色带。

若蛋白质样品和聚丙烯酰胺凝胶系统中加入带负电荷较多的十二烷基磺酸钠（SDS），使所有蛋白质颗粒表面覆盖一层 SDS 分子，导致蛋白质分子间的电荷差异消失，此时蛋白质在电场中的泳动速率仅与蛋白质颗粒大小有关。加之聚丙烯酰胺凝胶具有分子筛效应，因而此种称之为 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），常用于蛋白质分子量的测定。



●图 1-26　双向电泳技术分离蛋白质

在聚丙烯酰胺凝胶中加入系列两性电解质载体，在电场中形成一个连续而稳定的线性 pH 梯度，即 pH 从凝胶的正极向负极依次递增，电泳时被分离的蛋白质处在偏离其等电点的 pH 位置时带有电荷而移动，至该蛋白质 pI 值相等的 pH 区域时，其净电荷为零而不再移动，这种通过蛋白质等电点的差异而分离蛋白质的电泳方法称为等电聚焦电泳。

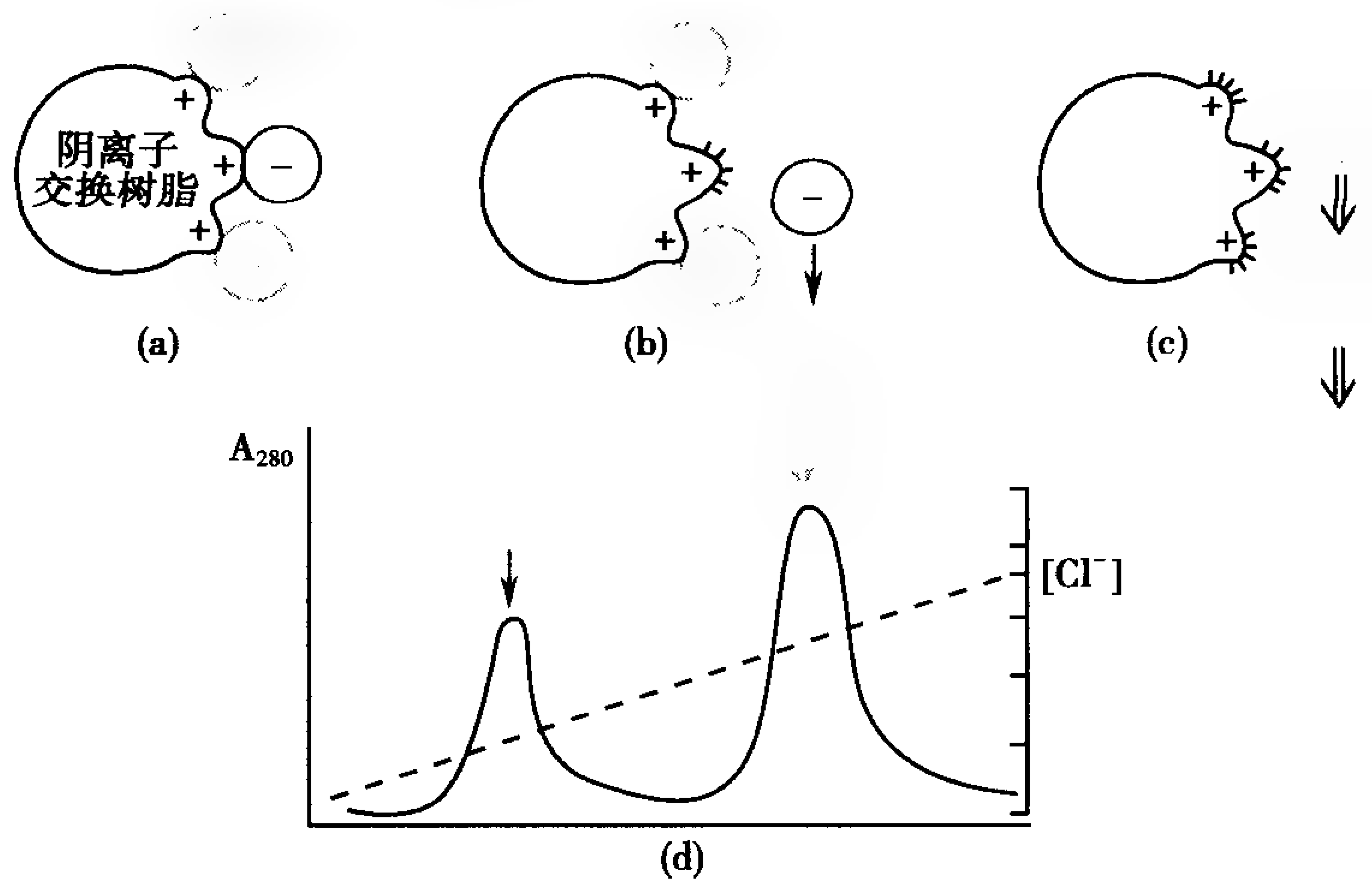
人类基因组计划完成后迎来了后基因组时代，其中蛋白质组学的研究颇受重视。双向凝胶电泳是蛋白质组学研究的重要技术之一。双向凝胶电泳是 O. Farrel 等人在 1977 年首次报道，其原理为第一向的蛋白质等电聚焦电泳，加之第二向的 SDS-PAGE，通过被分离蛋白质等电点和分子量的差异，将复杂蛋白质混合物在二维平面上分离（图 1-26）。随着技术的发展，包括 20 世纪 80 年代固相化 pH 梯度的完善而改善了双向凝胶电泳的重复性、80 年代后期电喷雾质谱和基质辅助的激光解析飞行时间质谱技术的发明以及近年来蛋白质双向电泳图谱的各种分析软件不断涌现，不仅使双向凝胶电泳的分辨率提高，而且进一步获取被分离的单个蛋白质的若干参数甚至翻译后修饰等信息，从而加速了蛋白质组学的研究进程。

四、应用相分配或亲和原理可将蛋白质进行层析分离

层析（chromatography）是蛋白质分离纯化的重要手段之一。一般而言，待分离蛋白质溶液（流动相）经过一种固态物质（固定相）时，根据溶液中待分离的蛋白质颗粒大小、电荷多少及亲和力等，将待分离的蛋白质组分在两相中反复分配，并以不同速度流经固定相而达到分离蛋白质的目的。层析种类很多，有离子交换层析、凝胶过滤和亲和层析等。其中离子交换层析和凝胶过滤应用最广。

蛋白质和氨基酸一样，是两性电解质，在某一特定 pH 时，各蛋白质的电荷量及性质不同，故可以通过离子交换层析得以分离（图 1-27）。

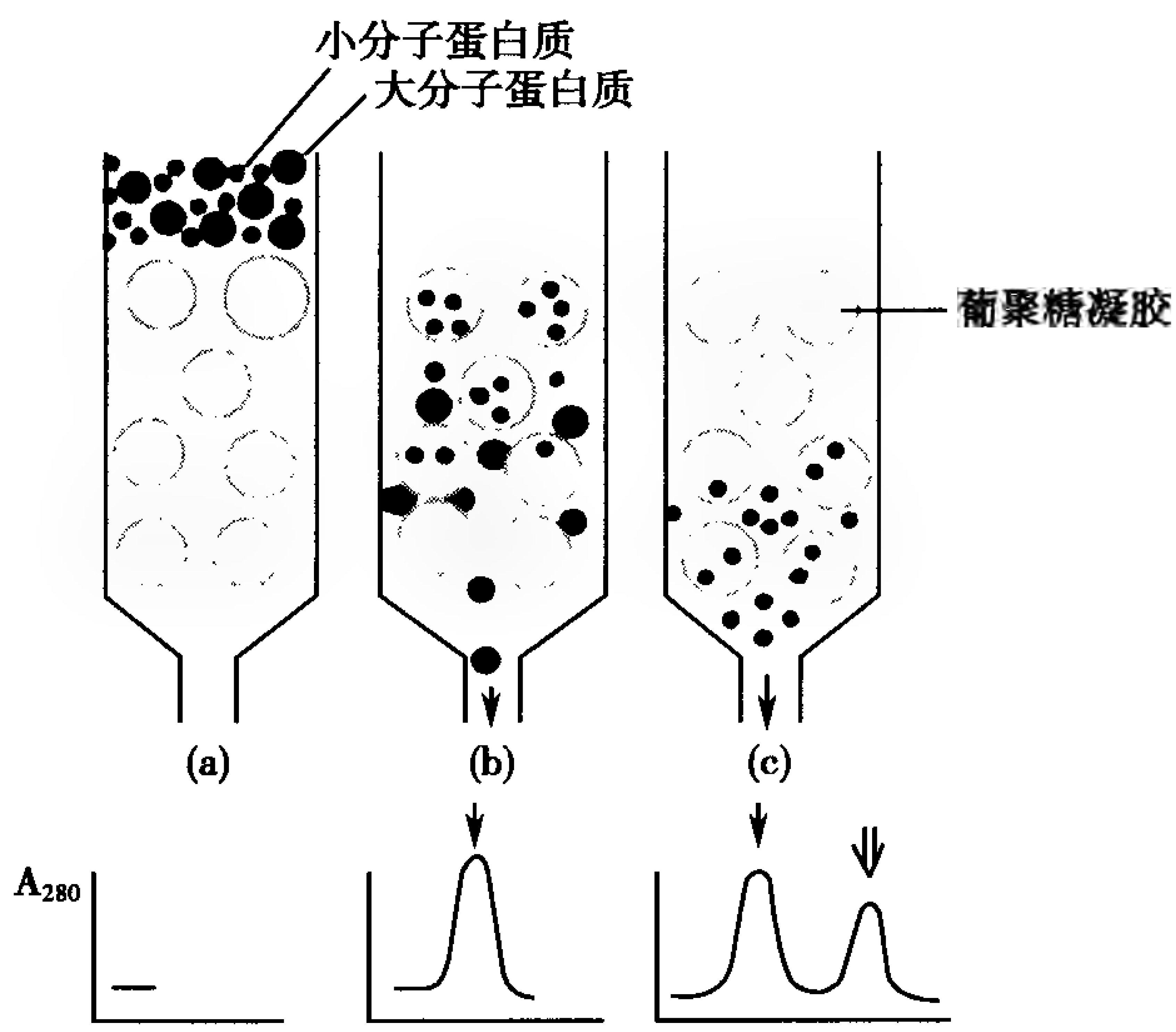
图 1-27 介绍的是阴离子交换层析，将阴离子交换树脂颗粒填充在层析管内，由



● 图 1-27 离子交换层析分离蛋白质
（a）样品全部交换并吸附到树脂上；（b）负电荷较少的分子用较稀的 Cl^- 或其他负离子溶液洗脱；（c）电荷多的分子随 Cl^- 浓度增加依次洗脱；（d）洗脱图
A_{280} 表示为 280nm 的吸光度

于阴离子交换树脂颗粒上带正电荷，能吸引溶液中的阴离子（图 1 27a）。然后再用含阴离子（如 Cl ）的溶液洗柱。含负电量小的蛋白质首先被洗脱下来（图 1-27b），增加 Cl^- 浓度。含负电量多的蛋白质也被洗脱下来（图 1 27c），于是两种蛋白质被分开。

凝胶过滤（gel filtration）又称分子筛层析。层析柱内填满带有小孔的颗粒，一般由葡聚糖制成。蛋白质溶液加于柱之顶部，任其往下渗漏，小分子蛋白质进入孔内，因而在柱中滞留时间较长，大分子蛋白质不能进入孔内而径直流出，因此不同大小的蛋白质得以分离（图 1 28）。



● 图 1-28 凝胶过滤分离蛋白质
（a）大球是葡聚糖凝胶颗粒；（b）样品上柱后，小分子进入凝胶微孔，大分子不能进入，故洗脱时大分子先洗脱下来；（c）小分子后洗脱出来

五、利用蛋白质颗粒沉降行为不同可进行超速离心分离

超速离心法（ultracentrifugation）既可以用来分离纯化蛋白质也可以用作测定蛋白质的分子量。蛋白质在高达 50 万 g（g 为 gravity，即地心引力）的重力作用下，在溶液中逐渐沉降，直至其浮力（buoyant force）与离心所产生的力相等，此时沉降停止。不同蛋白质其密度与形态各不相同，因此用上述方法可将它们分开。蛋白质在离心场中的行为用沉降系数（sedimentation coefficient，S）表示，系数与蛋白质的密度和形状相关。

$$S=\frac{dx/dt}{\omega^2 x}\times 10^{13}$$

dx/dt 代表颗粒在离心场中的移动速率，ω 为离心头的角速度，x 是距转动中心的距离，t 为离心时间。沉降系数（S）使用 Svedberg 单位（$1S=1\times 10^{-13}$秒）。

应用超速离心法测定蛋白质分子量时，一般用一个已知分子量的标准蛋白质作为参照，因为沉降系数 S 大体上和分子量成正比关系（表 1 3），它的计算式如下：

$$\frac{S_{未知}}{S_{标准}}=\left(\frac{Mr_{未知}}{Mr_{标准}}\right)^{\frac{2}{3}}$$

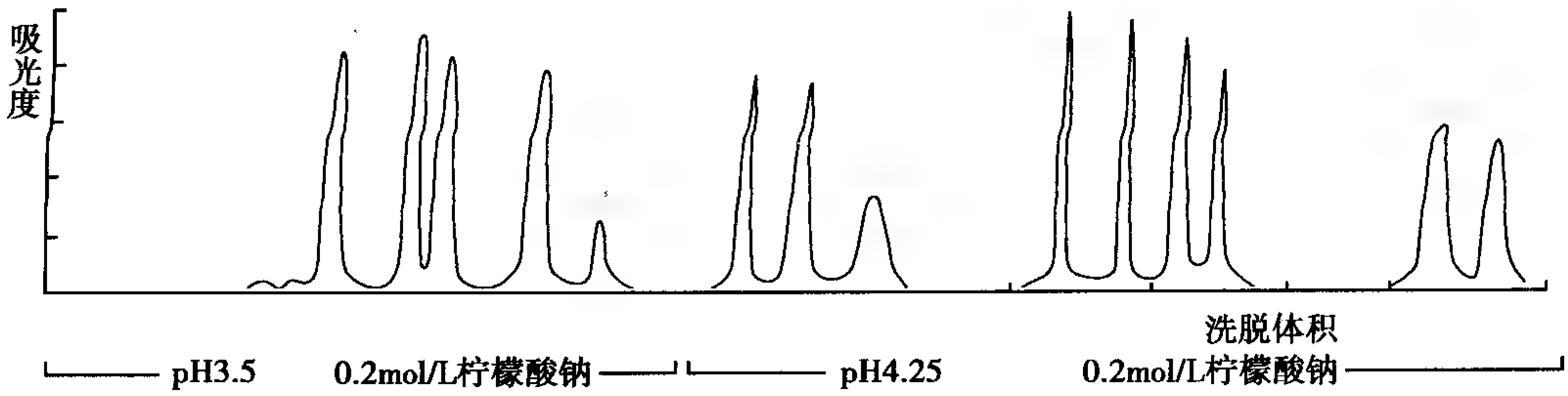
这一算式对大多数球状蛋白质都适用，但大多数纤维状蛋白质由于其分子形状的高度不对称性，无法使用上述简单算式。

表 1-3　蛋白质的分子量和沉降系数

蛋白质	分子量	S
细胞色素 c（牛心）	13370	1.17
肌红蛋白（马心）	16900	2.04
糜蛋白酶原（牛胰）	23240	2.54
β-乳球蛋白（羊奶）	37100	2.90
血红蛋白（人）	64500	4.50
血清白蛋白（人）	68500	4.60
过氧化氢酶（马肝）	247500	11.30
脲酶（刀豆）	482700	18.60
纤维蛋白原	339700	7.60

六、应用化学或反向遗传学方法可分析多肽链的氨基酸序列

自从 1953 年 Sanger 首次完成胰岛素的氨基酸顺序测定以来，目前已有很大改进。当时 Sanger 花费多年时间才基本搞清胰岛素的一级结构，现今由于方法改进及自动化分析仪器的产生，已有数百种蛋白质的氨基酸序列问世。首先分析已纯化蛋白质的氨基酸残基组成。蛋白质经盐酸水解后成为个别氨基酸，用离子交换树脂将各种氨基酸分开，测定它们的量，算出各氨基酸在蛋白质中的百分组成或个数（图 1-29）。第二步测定多肽链的氨基末端与羧基末端为何种氨基酸残基。Sanger 当年用二硝基氟苯与多肽链的 α-氨基作用生成二硝基苯氨基酸，然后将多肽水解，分离出带有二硝基苯基的氨基酸。目前多用丹酰氯使之生成丹酰衍生物，该物质具强荧光，更易鉴别。羧基端氨基酸残基可用羧肽酶将羧基端氨基酸残基水解下来。当头、尾两端的氨基酸残基鉴定以后，此两头可作为整条肽链的标志点（表 1 4）。



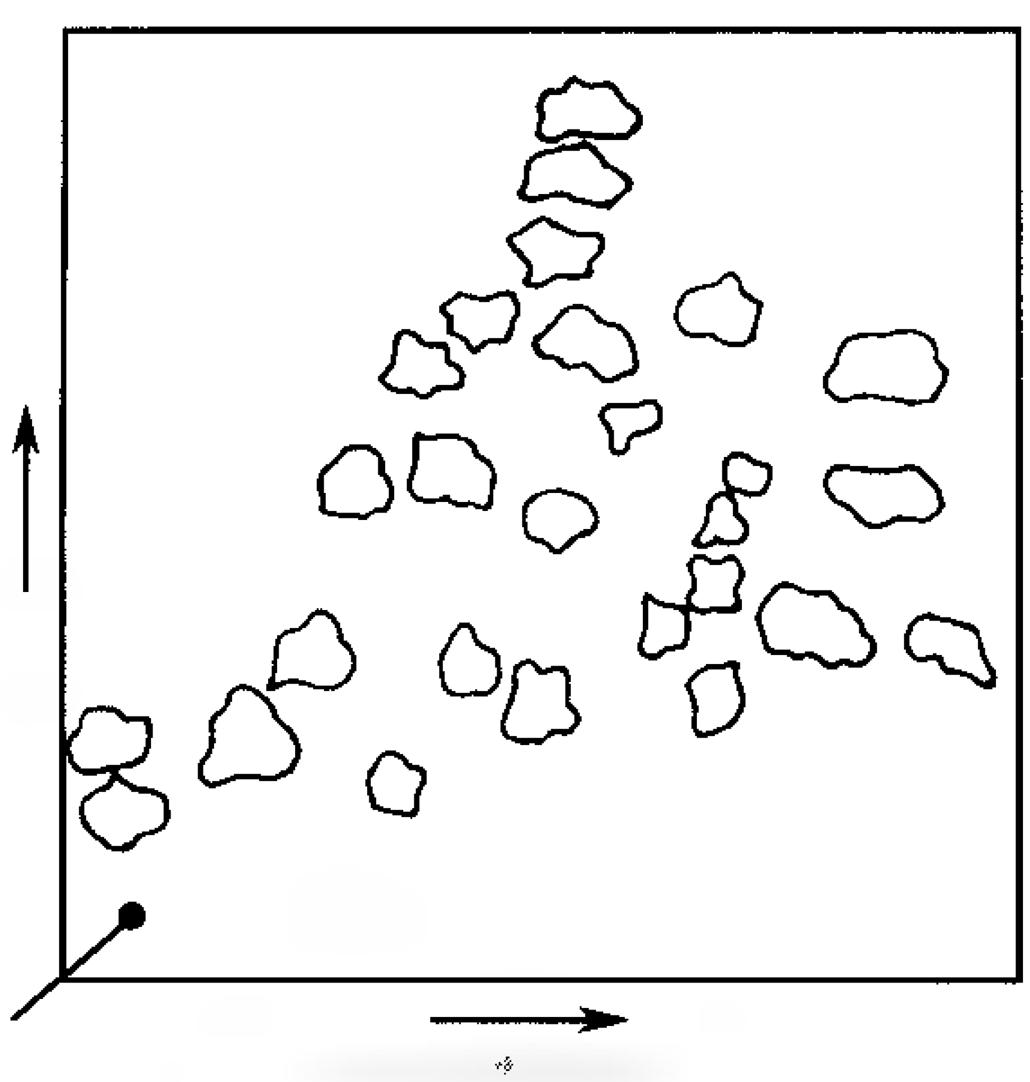
●图 1-29　离子交换层析分析蛋白质的氨基酸组分

第三步是把肽链水解成片段，分别进行分析。方法甚多，常用胰蛋白酶法、胰凝乳蛋白酶法、溴化氰法等。胰蛋白酶能水解赖氨酸或精氨酸的羧基所形成的肽键。所以如果蛋白质分子中有 4 个精氨酸及赖氨酸残基，则可得 5 个片段。

表 1-4　氨基酸和肽的末端测定法

化学法	二硝基氟苯法（DNP 法）	肼解法
	二甲基氨基萘磺酰氯法（Dansyl-氯法）	还原成氨基醇法
酶解法	亮氨酸氨肽酶法	羧肽酶 A 法
	细胞外氨肽酶法	羧肽酶 B 法
		羧肽酶 C 法

胰凝乳蛋白酶水解芳香族氨基酸（苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸）羧基侧的肽键，溴化腈水解甲硫氨酸羧基侧的肽键。由水解生成的肽段，可用离子层析或其他层析方法将其分离纯化，如用双向纸电泳，可以得到肽图（图 1-30），由此可知肽段的多少。

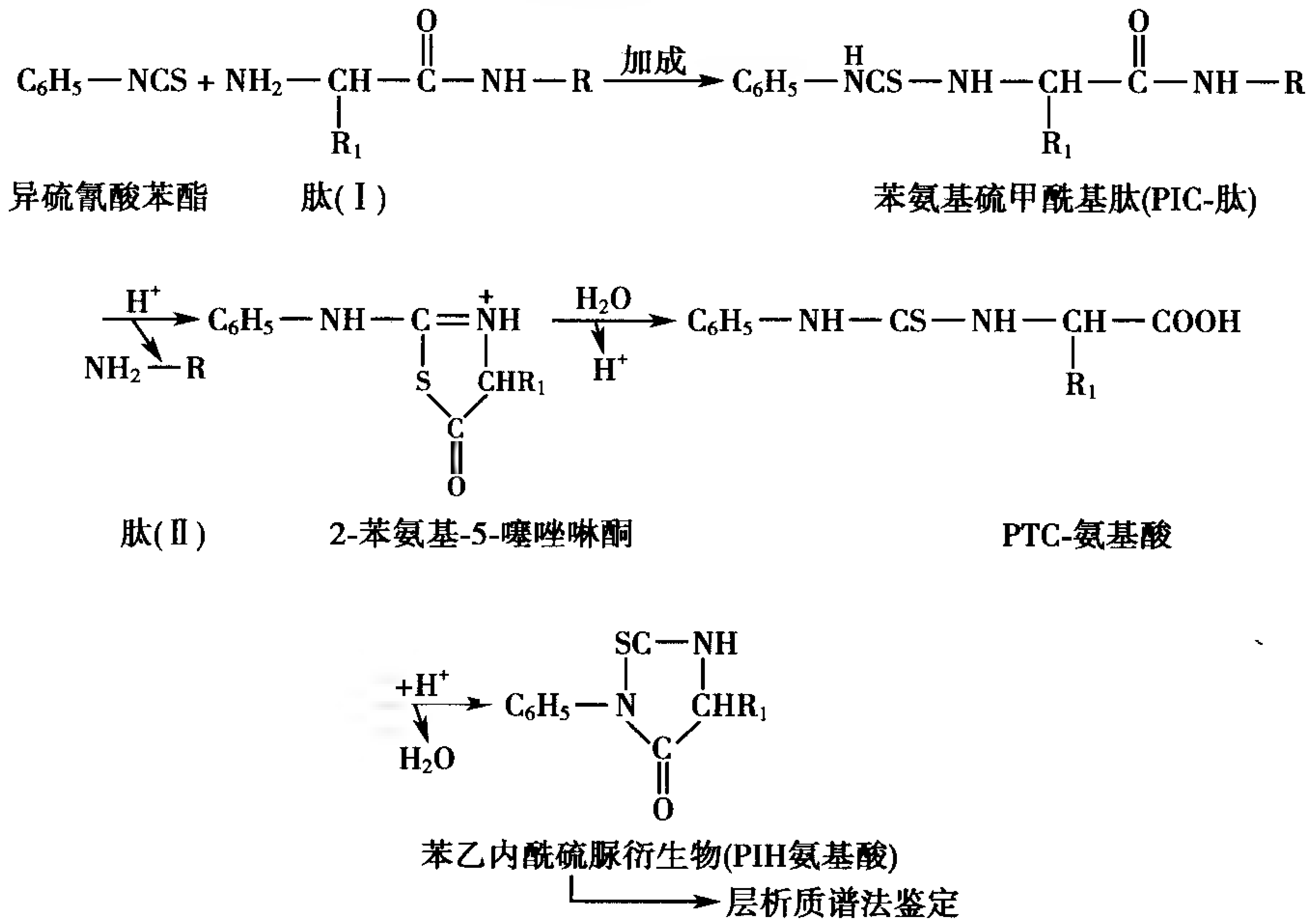


●图 1-30　人血红蛋白双向肽图

然后测定各肽段的氨基酸排列顺序，一般采用 Edman 降解法。肽段先与异硫氰酸苯酯反应，该试剂只与氨基末端氨基酸的游离 α 氨基作用。再用冷稀酸处理，氨基末端残基即从肽链脱落下来，成为异硫氰酸苯酯衍生物，用层析可鉴定为何种氨基酸衍生物。残留的肽链可继续与异硫氰酸苯酯作用。依次鉴定出氨基酸的排列顺序。

如前所述，一条多肽链可被水解成若干片段，如图 1-31 中，已被水解成 27 个片段。这些肽段经过分离纯化后，即可进行氨基酸顺序测定。但是获得了这些数据之后，还不能得出整条多肽链的氨基酸排列顺序，因为尚不清楚这些片段在多肽链中的前后次序。一般需用数种水解法，并分析出各肽段中的氨基酸顺序，然后经过组合排列对比，最终得出完整肽链中氨基酸顺序的结果。

近年来，由于核酸的研究在理论上及技术上的迅猛发展，人们开始通过核酸来推演蛋白质中的氨基酸序列。蛋白质中的氨基酸顺序是从信使 RNA（mRNA）中核苷酸序列翻译过来的，因此只要找到相应的 mRNA 测出它的核苷酸顺序，氨基酸序列也就清楚了。此方法是先分离编码蛋白质的基因，测定 DNA 序列，排列出 mRNA 序列，按照三联密码的原则推演出氨基酸的序列。目前多数蛋白质的氨基酸序列都是通过此方法而获知的。



● 图 1-31　肽的氨基酸末端测定法

七、应用物理学、生物信息学原理可进行蛋白质空间结构测定

大量生物体内存在的蛋白质空间结构的解析，对于研究蛋白质结构与功能的内在关系至关重要，也为蛋白质或多肽药物的结构改造以致增强作用及减弱副作用而提供理论依据。由于蛋白质的空间结构十分复杂，因而其测定的难度也较大，而且还需昂贵的仪器设备和先进的技术。随着结构生物学的发展，蛋白质二级结构和三维空间结构的测定也已普遍开展。

通常采用圆二色光谱（circular dichroism，CD）测定溶液状态下的蛋白质二级结构含量。CD 谱对二级结构非常敏感，α 螺旋的 CD 峰有 222nm 处的负峰、208nm 处的负峰和 198nm 处的正峰三个成分；而 β-折叠的 CD 谱不很固定。可见测定含 α-螺旋较多的蛋白质，所得结果更为准确。

X 射线衍射法（X-ray diffraction）和核磁共振技术（nuclear magnetic resonance，NMR）是研究蛋白质三维空间结构最准确的方法。通常采用的 X 射线衍射法，首先要将蛋白质制备成晶体。但是迄今为止，并非所有纯化蛋白质都能制备成满意的，能供三维结构分析的晶体。例如糖蛋白，由于蛋白质分子中糖基化位点和某些位点的糖链结构存在不均一性，很难获得糖蛋白的晶体。X 射线射至蛋白质晶体上，可产生不同方向的衍射，X 光片则接受衍射光束，形成衍射图。这种衍射图也就是 X 射线穿过晶体的一系列平行剖面所产生的电子密度图。然后借助计算机绘制出三维空间的电子密度图。如一个肌红蛋白的衍射图有 25000 个斑点，通过对这些斑点的位置、强度进行计算，已得出其空间结构。此外，近年建立的二维核磁共振技术，也已用于测定蛋白质三维空间结构。

由于蛋白质空间结构的基础是一级结构，通过直接的蛋白质测序或核苷酸测序，已获得几十万条蛋白质序列，其中仅 7000 条来自于 X 射线晶体结构和 NMR 结构。近年来根据蛋白质的氨基酸序列预测其三维空间结构，受到科学家的关注。目前有几种蛋白质结构预测方法。

1. 同源模建　将待研究的序列与已知结构的同源蛋白质序列对齐→补偿氨基酸替补、插入和缺失→通过模建和能量优化计算，产生目标序列的三维结构。序列相似性越高，预测的模型也越准确。

2. 折叠识别　通过预测二级结构、预测折叠方式和参考其他蛋白质的空间结构，从而产生目标序列的三维结构。

3. 从无到有　根据单个氨基酸形成二级结构的倾向，加上各种作用力力场信息，直接产生目标序列的三维结构。

同源建模方法目前被认为是最精确的方法。同源性大于50%时，结果比较可靠；同源性在30%～50%之间，其结果则需要参考其他蛋白的信息；同源性小于30%时，人们一般采用折叠识别方法。同源性更小时，从无到有法更有效。

应用NMR测定蛋白质空间结构

自20世纪80年代中期开始，由于二维核磁共振（NMR）光谱技术以及近来三维、四维NMR光谱技术的发展，分子量较小的蛋白质（少于250个氨基酸残基）溶液构象测定已成为现实，K. Wüthrich对此作出了重要的贡献。水溶液中小分子蛋白质样品置于磁场中，由射频脉冲诱导的瞬时磁化将随时间衰减，并弛豫至平衡态，弛豫过程给出丰富的有关大分子结构与动态信息。蛋白质溶液的NMR光谱在原子水平上揭示了蛋白质的三维空间结构，并提供X射线所不及的动态信息。在二维NMR中，通过改变外加信号的特征，可以从空间距离小于5×10^{-10}m的质子间相互作用和仅由一个或两个其他原子共价连接的质子间相互作用中获得更多的信息。由此得到一系列距离加上已知的几何因素，如共价键长、键角、基团平面性、手性和范德华半径等，可用于计算蛋白质的三维结构。

小　　结

蛋白质是重要的生物大分子，在体内分布广泛，含量丰富，种类繁多。每一种蛋白质都有其特定的空间构象和生物学功能。

组成蛋白质的基本单位为*L*-α-氨基酸，共有20种，可分为非极性疏水性氨基酸、极性中性氨基酸、酸性氨基酸和碱性氨基酸四类。氨基酸属于两性电解质，在溶液的pH等于其pI时，氨基酸呈兼性离子。氨基酸可通过肽键相连成肽。小于10个氨基酸组成的肽称为寡肽，大于10个氨基酸的肽则称为多肽。体内存在许多如GSH、促甲状腺释放激素和神经肽等重要的生物活性肽。

蛋白质的结构可分成一级、二级、三级和四级结构四个层次。蛋白质一级结构是指蛋白质分子中氨基酸从N端至C端的排列顺序，即氨基酸序列，其连接键为肽键，还包括二硫键的位置。形成肽键的6个原子处于同一平面，构成了所谓的肽单元。通过二级、三级和四级结构研究蛋白质的空间构象，分层次阐述蛋白质的三维立体结构。二级结构是指蛋白质主链局部的空间结构，不涉及氨基酸残基侧链构象。主要为α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规卷曲，以氢键维持其稳定性。在蛋白质分子中，空间上相互邻近的两个或三个具有二级结构的肽段，完成特定的生物学功能，称之为模体。三级结构是指多肽链主链和侧链的全部原子的空间排布位置。三级结构的形成和稳定主要靠次级键。一些蛋白质的三级结构可形成一个或数个球状或纤维状的区域，各行其功能，称为结构域。四级结构是指蛋

白质亚基之间的缔合，主要也靠次级键维系。根据蛋白质的形状，可分成球状蛋白质和纤维状蛋白质。根据组成成分，还可分成单纯蛋白质和结合蛋白质，前者仅含有氨基酸，后者除氨基酸外，还含有非蛋白质的辅基成分。

体内存在数千万种蛋白质，各有其特定的结构和特殊的生物学功能。一级结构是空间构象的基础，也是功能的基础。一级结构相似的蛋白质，其空间构象及功能也相近。若蛋白质的一级结构发生改变则影响其正常功能，由此引起的疾病称为分子病。

生物体内蛋白质的合成、加工和成熟是一个复杂的过程，其中多肽链的正确折叠对其正确构象形成和功能发挥至关重要。蛋白质折叠成正确的空间构象过程，除一级结构是其决定因素外，还需要分子伴侣的参与。若蛋白质的折叠发生错误，虽然其一级结构不变，但蛋白质的构象发生改变，仍可影响其功能，严重时可导致疾病发生，有人将此类疾病称为蛋白质构象疾病。

蛋白质空间构象与功能有着密切关系。血红蛋白亚基与 O_2 结合可引起另一亚基构象变化，使之更易与 O_2 结合，所以血红蛋白的氧解离曲线呈 S 型。这种变构效应是蛋白质中普遍存在的功能调节方式之一。蛋白质的空间构象发生改变，可导致其理化性质变化和生物活性的丧失。蛋白质发生变性后，只要其一级结构未遭破坏，仍可在一定条件下复性，恢复原有的空间构象和功能。

分离纯化蛋白质是研究单个蛋白质结构与功能的先决条件。通常利用蛋白质的理化性质，采取不损伤蛋白质结构和功能的物理方法来纯化蛋白质。

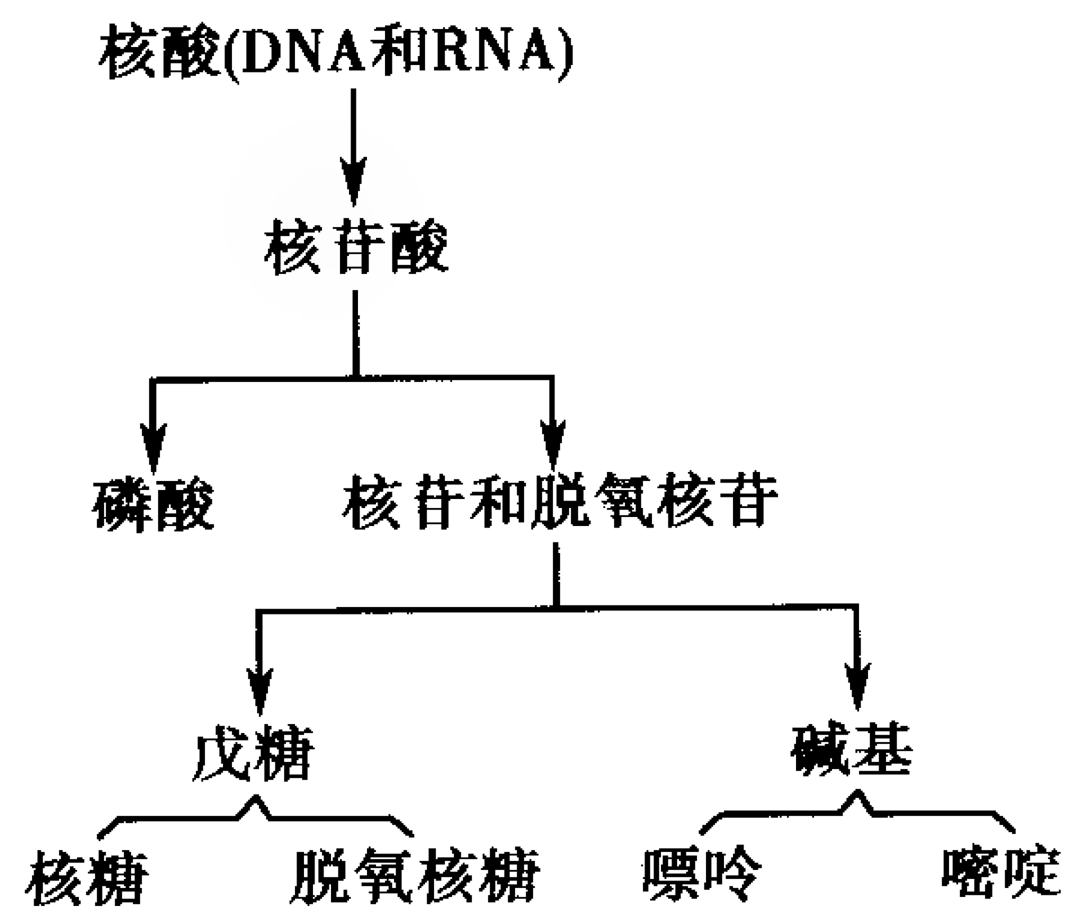
（查锡良）

第二章　核酸的结构与功能

核酸（nucleic acid）是以核苷酸为基本组成单位的生物信息大分子，具有复杂的结构和重要的生物功能。核酸可以分为脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid，DNA）和核糖核酸（ribonucleic acid，RNA）两类。DNA存在于细胞核和线粒体内，携带遗传信息，并通过复制的方式将遗传信息进行传代。细胞以及个体的基因型（genotype）是由这种遗传信息决定的。RNA是DNA的转录产物，参与遗传信息的复制和表达。RNA存在于细胞质、细胞核和线粒体内。在某些情况下，RNA也可以作为遗传信息的载体。

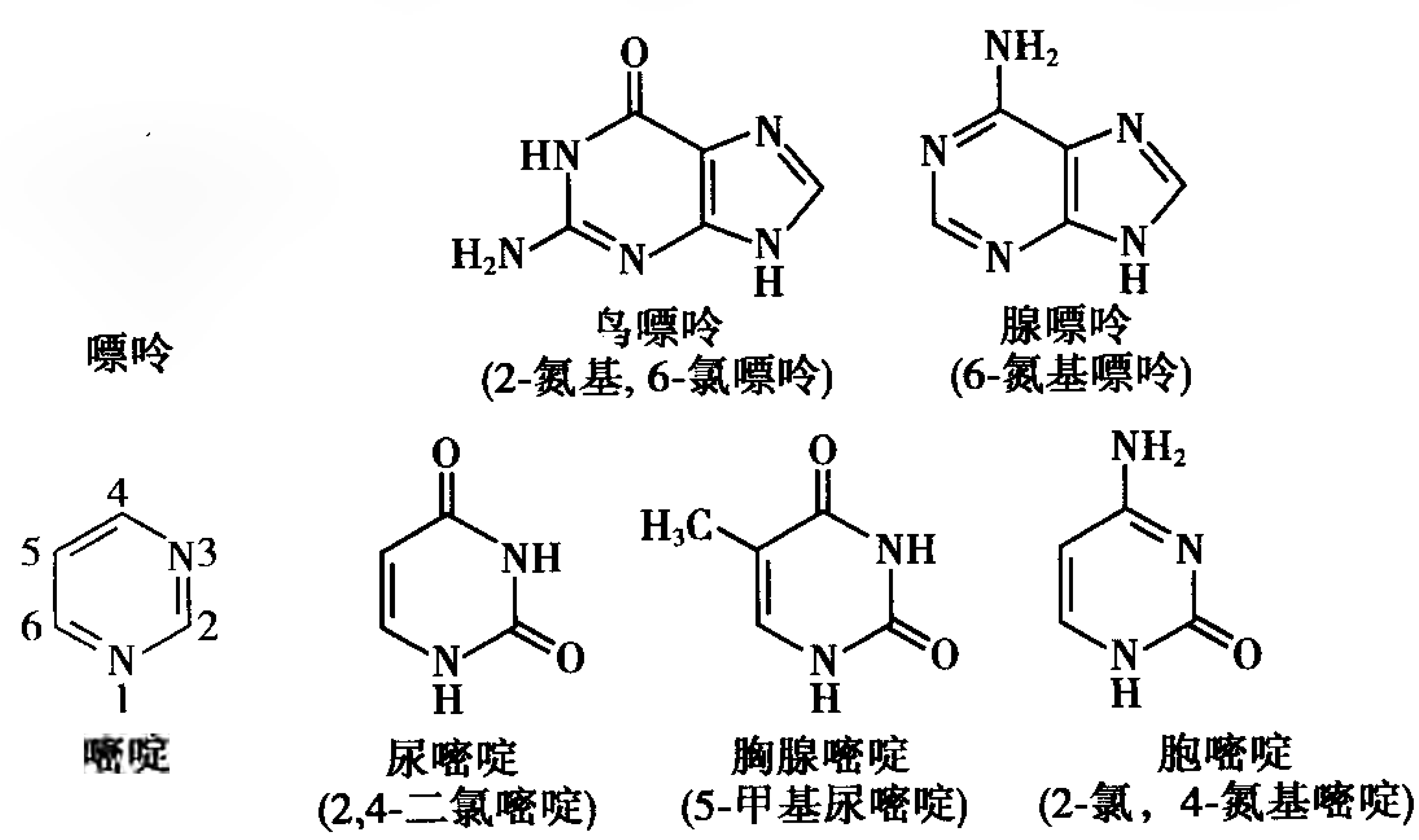
第一节　核酸的化学组成及一级结构

核酸在核酸酶作用下水解成核苷酸（nucleotide），而核苷酸完全水解后可释放出等量摩尔的碱基、戊糖和磷酸。这表明构成核酸的基本组分之间具有一定的对应关系。DNA的基本组成单位是脱氧核苷酸（deoxyribonucleotide），而RNA的基本组成单位是核苷酸（ribonucleotide）。



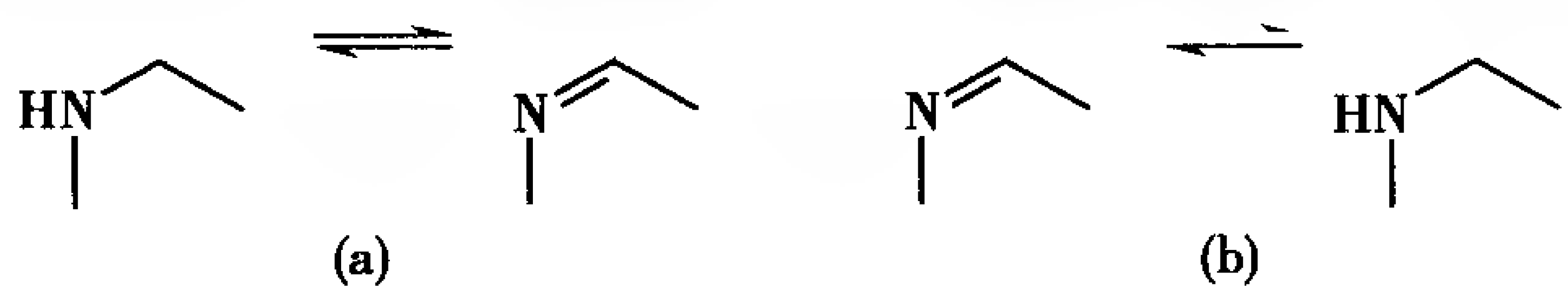
一、核苷酸是构成核酸的基本组成单位

碱基（base）是构成核苷酸的基本组分之一。碱基是含氮的杂环化合物，可分为嘌呤（purine）和嘧啶（pyrimidine）两类（图2 1）。常见的嘌呤包括腺嘌呤（adenine，A）和



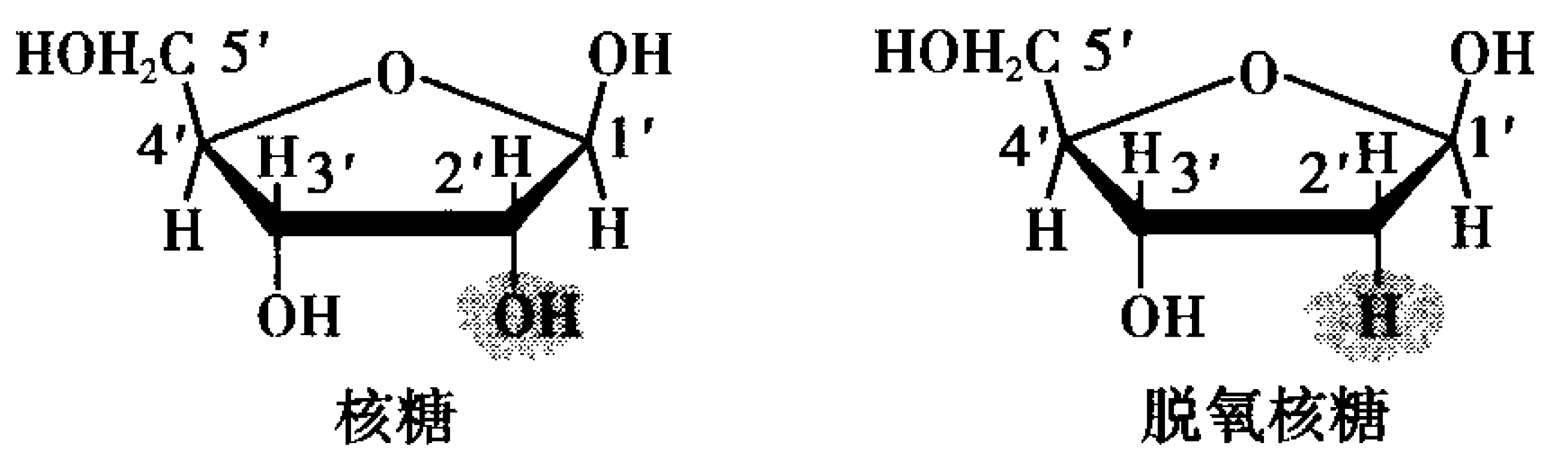
●图2-1　构成核苷酸的嘌呤和嘧啶的化学结构式

鸟嘌呤（guanine，G），常见的嘧啶包括尿嘧啶（uracil，U）、胸腺嘧啶（thymine，T）和胞嘧啶（cytosine，C）。构成 DNA 的碱基有 A、G、C 和 T；而构成 RNA 的碱基有 A、G、C 和 U。尿嘧啶是 RNA 中特有的碱基。碱基的各个原子分别加以编号以便于区分。这五种碱基的酮基或氨基受介质 pH 的影响可形成酮-烯醇（keto-enol）互变异构体或氨基-亚氨基（amino-imino）互变异构体，这为碱基之间形成氢键提供了结构基础（图 2-2）。



●图 2-2　碱基的互变异构体
（a）酮-烯醇互变异构体；（b）氨基-亚氨基互变异构体

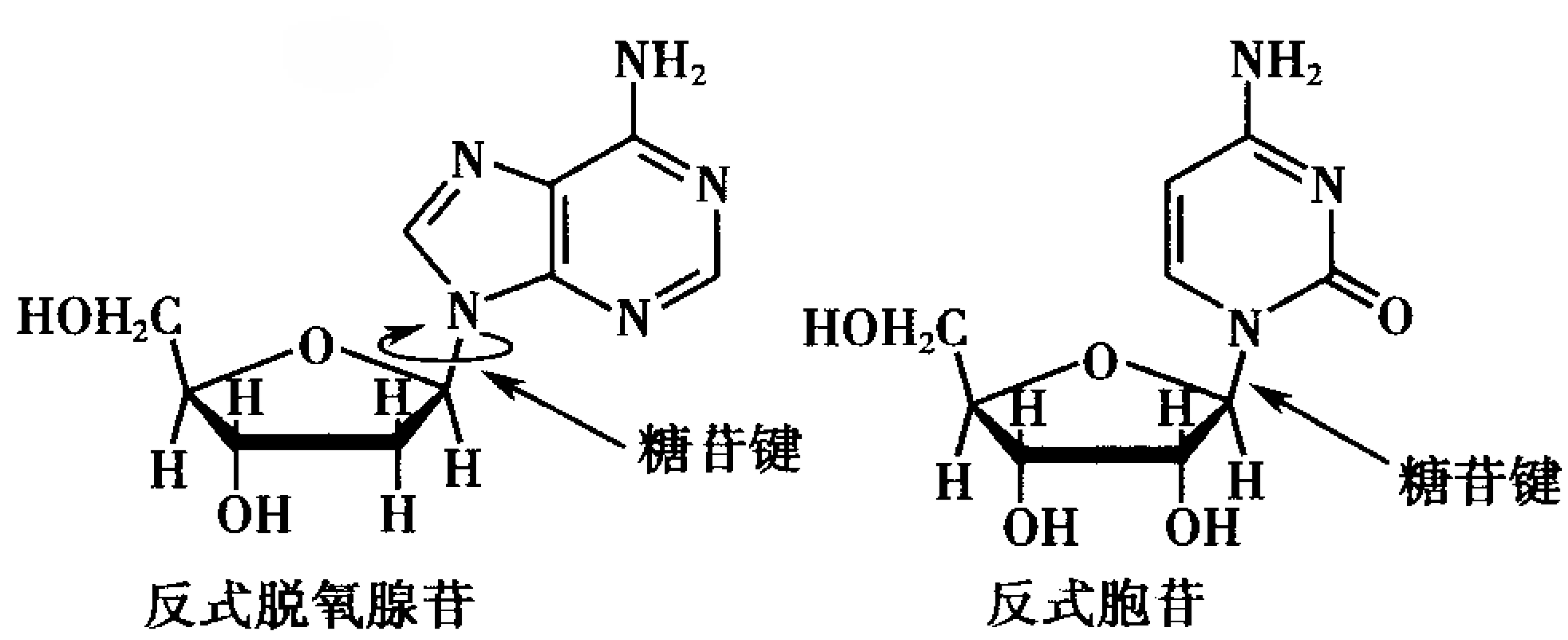
戊糖（pentose）是构成核苷酸的另一个基本组分。为了有别于碱基的原子，戊糖的碳原子标以 C-1′、C-2′…C-5′（图 2-3）。戊糖有 β-D-核糖（ribose）和 β-D-2′-脱氧核糖（deoxyribose）之分。两者的差别仅在于 C-2′原子所连接的基团。核糖存在于 RNA 中，而脱氧核糖存在于 DNA 中。戊糖的结构差异使得 DNA 较 RNA 在化学上更为稳定，从而被自然选择为遗传信息的载体。



●图 2-3　构成核苷酸的核糖和脱氧核糖的化学结构式
在核糖 C-2′原子上有一个羟基，而脱氧核糖 C-2′原子上则没有羟基

碱基和核糖或脱氧核糖生成核苷（nucleoside）或脱氧核苷（deoxynucleoside）。戊糖的 C-1′原子和嘌呤的 N-9 原子或嘧啶的 N-1 原子通过缩合反应形成了 N-糖苷键（N-glycosidic bond）。在天然条件下，由于空间位阻效应，戊糖和碱基处在反式构象（anti conformation）上（图 2-4）。

核苷或脱氧核苷 C-5′原子上的羟基可以与磷酸反应，脱水后生成酯键，构成核苷酸或脱氧核苷酸。根据连接的磷酸基团的数目不同，核苷酸可分为核苷一磷酸（nucleoside monophosphate，NMP）、核苷二磷酸（nucleoside diphosphate，NDP）和核苷三磷酸（nucleoside triphosphate，NTP）。各个磷原子分别标以 α、β 和 γ 以示区别（图 2-5）。构成核酸的碱基、核苷以及核苷酸的中英文名称见表 2-1a 和表 2-1b。表中核苷和核苷酸名称均采用缩写，如腺苷代表腺嘌呤核苷、鸟苷代表鸟嘌呤核苷等。



●图 2-4　核苷和脱氧核苷的化学结构式
碱基通过糖苷键与戊糖连接，碱基可以绕糖苷键自由转动

表 2-1a　构成 RNA 的主要碱基、核苷以及单磷酸核苷酸的名称和符号

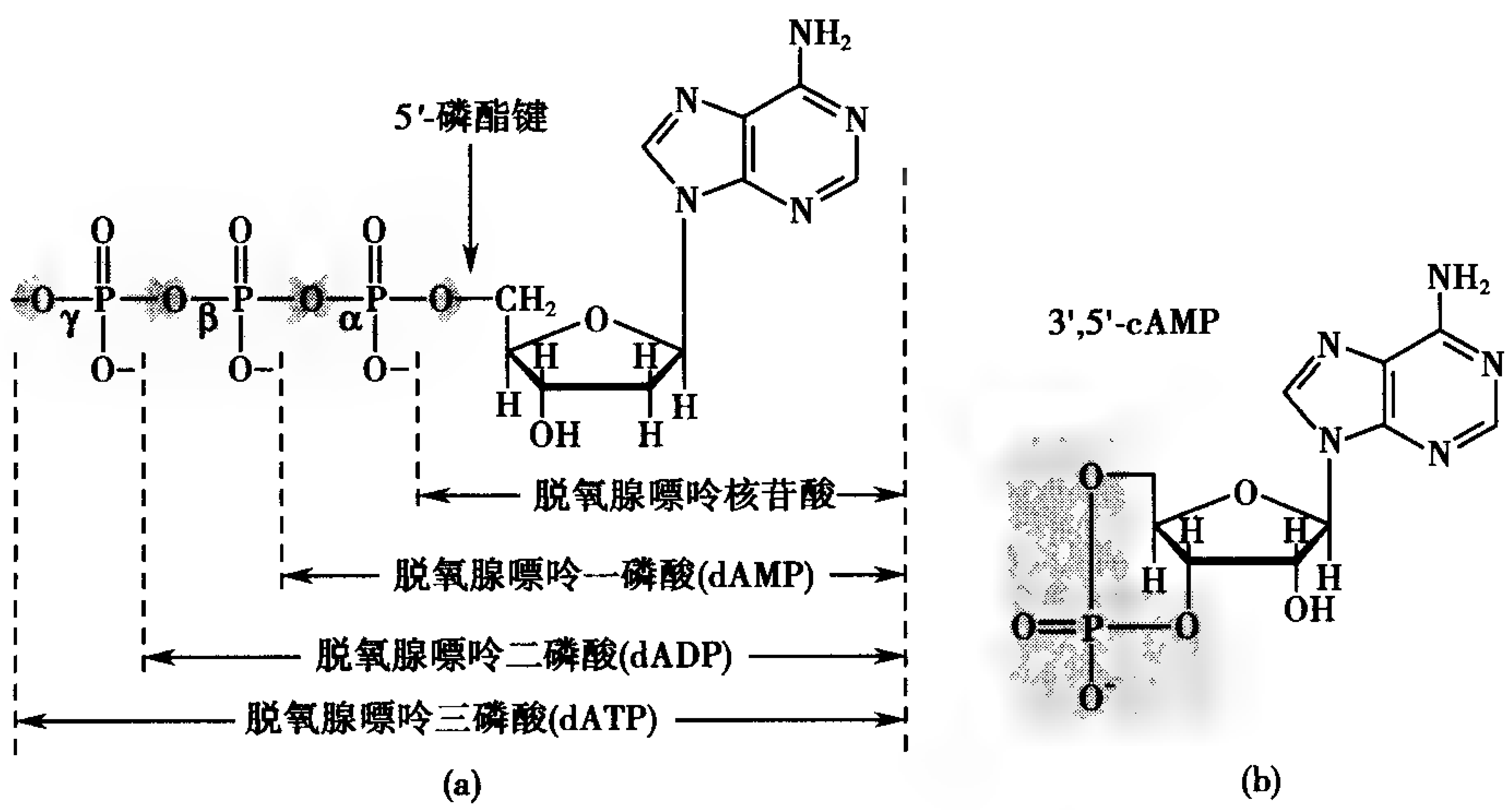
碱基（base）	核苷（nucleoside）	核苷酸（nucleotide monophosphate，NMP）
腺嘌呤（adenine，A）	腺苷（adenosine）	腺苷一磷酸（adenosine monophosphate，AMP）
鸟嘌呤（guanine，G）	鸟苷（guanosine）	鸟苷一磷酸（guanosine monophosphate，GMP）
胞嘧啶（cytosine，C）	胞苷（cytidine）	胞苷一磷酸（cytidine monophosphate，CMP）
尿嘧啶（uracil，U）	尿苷（uridine）	尿苷一磷酸（uridine monophosphate，UMP）

表 2-1b 构成 DNA 的主要碱基、核苷以及单磷酸核苷酸的名称和符号

碱基（base）	脱氧核苷（deoxynucleoside）	脱氧核苷酸（deoxynucleotide monophosphate，NMP）
腺嘌呤（adenine，A）	脱氧腺苷（deoxyadenosine）	脱氧腺苷一磷酸（deoxyadenosine monophosphate，dAMP）
鸟嘌呤（guanine，G）	脱氧鸟苷（deoxyguanosine）	脱氧鸟苷一磷酸（deoxyguanosine monophosphate，dGMP）
胞嘧啶（cytosine，C）	脱氧胞苷（deoxycytidine）	脱氧胞苷一磷酸（deoxycytidine monophosphate，dCMP）
胸腺嘧啶（thymine，T）	脱氧胸苷（deoxythymidine 或 thymidine）	脱氧胸苷一磷酸（deoxythymidine monophosphate，dTMP）

注：AMP 的英文名称还有：adenylate 或 adenylatic acid；dAMP 的英文名称还有：deoxyadenylate 或 deoxyadenylatic acid，其他核苷酸和脱氧核苷酸亦有类似多种英文名称。

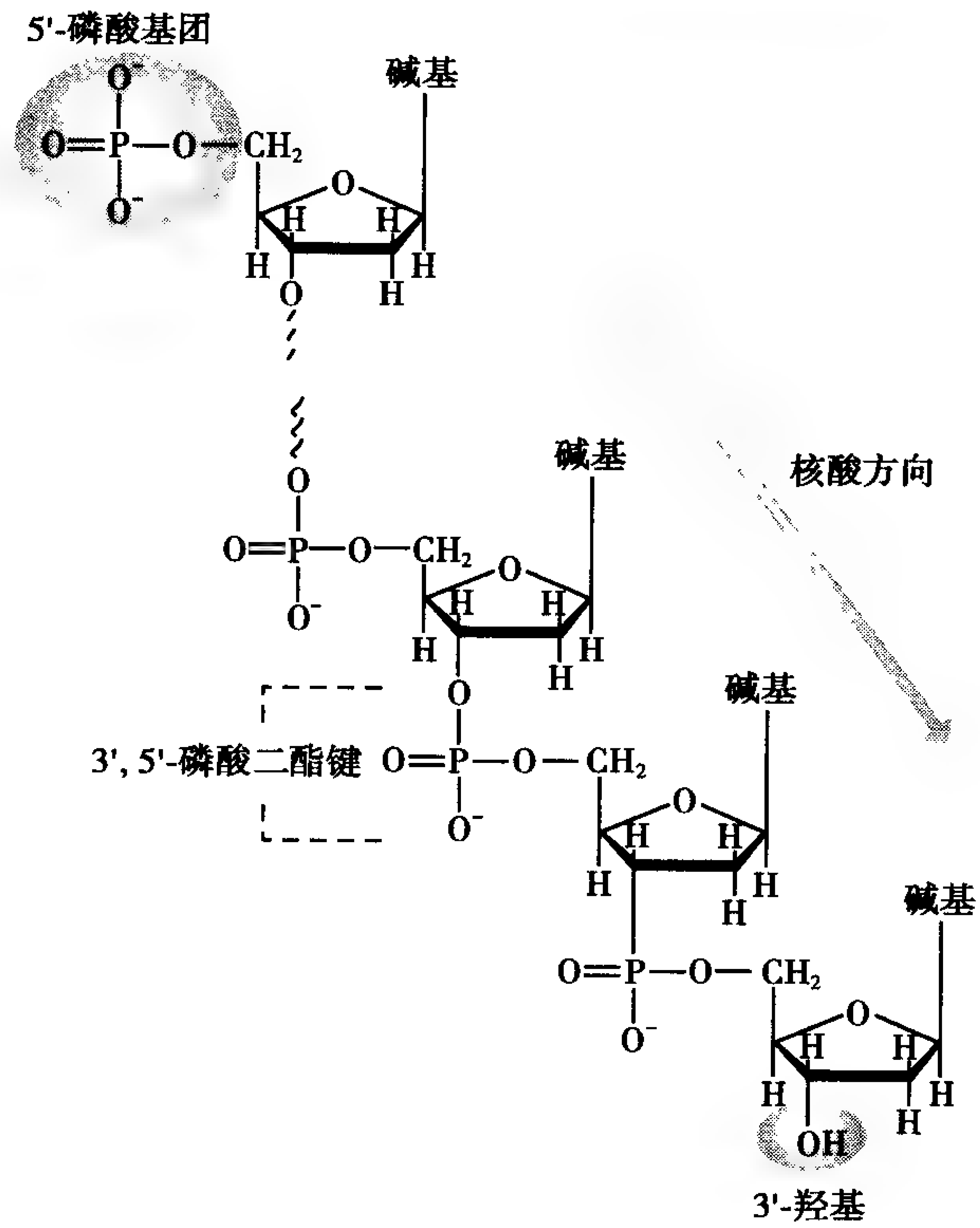
在体内，核苷酸除了构成核酸外，还会以其他衍生物的形式参与各种物质代谢的调控和多种蛋白质功能的调节。例如环腺苷酸（cyclic AMP，cAMP）和环鸟苷酸（cyclic GMP，cGMP）是细胞信号转导过程中的第二信使，具有重要调控作用（图 2-5）。



●图 2-5 核苷酸的化学结构
(a) 脱氧腺苷一磷酸、脱氧腺苷二磷酸和脱氧腺苷三磷酸；(b) 3′,5′-环腺苷酸

二、DNA 是脱氧核苷酸通过 3′,5′-磷酸二酯键连接形成的大分子

脱氧核苷酸 C 3′原子的羟基能够与另一个脱氧核苷酸 C-5′原子的磷酸基团缩合形成 3′,5′-磷酸二酯键（phosphodiester bond），生成了一个二聚脱氧核苷酸分子。这个二聚脱氧核苷酸分子仍保留着 C-5′原子的磷酸基团和 C-3′原子的羟基，使得这个二聚脱氧核苷酸分子具有 5′-末端和 3′-末端之分的方向性。这个二聚脱氧核苷酸分子 C-3′原子的羟基可以继续与第三个脱氧核苷酸 C-5′原子的磷酸基团反应，生成一个含有二个 3′,5′-磷酸二酯键的三聚脱氧核苷酸分子。这样的酯化反应可以继续下去，由此产生了一个由多个脱氧核苷酸构成的、具有方向性的线性大分子，称为多聚脱氧核苷酸（polydeoxynucleotides），即 DNA（图 2-6）。



●图 2-6 多聚核苷酸的化学结构式

脱氧核苷酸通过 3′,5′-磷酸二酯键的连接形成多聚核苷酸。
多聚核苷酸链的 5′-末端是磷酸基团，3′-末端是羟基

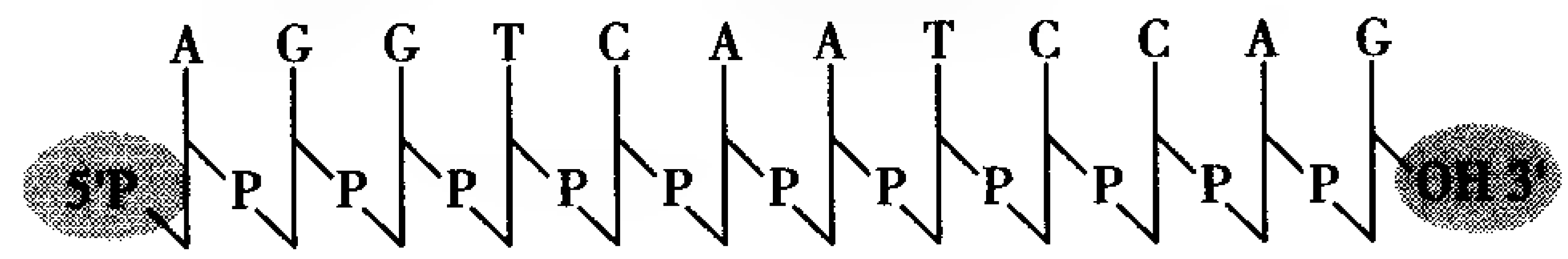
三、RNA 也是具有 3′，5′-磷酸二酯键的线性大分子

类似于 DNA，RNA 也是多个核苷酸分子通过酯化反应形成的线性大分子，并且具有方向性。它与 DNA 的差别在于：①RNA 核苷酸的戊糖是核糖而不是脱氧核糖；②RNA 的嘧啶是胞嘧啶和尿嘧啶，而没有胸腺嘧啶，所以构成 RNA 的四种基本核苷酸是 AMP、GMP、CMP 和 UMP。

四、核酸的一级结构是核苷酸的排列顺序

核酸的一级结构（primary structure）是构成核酸的核苷酸或脱氧核苷酸从 5′-末端到 3′-末端的排列顺序，也就是核苷酸序列（nucleotide sequence）。由于核苷酸之间的差异在于碱基的不同，因此核酸的一级结构也就是它的碱基序列（base sequence）。由于核酸分子具有方向性，规定它们的核苷酸或脱氧核苷酸的排列顺序和书写规则必须是从 5′-末端到 3′-末端（图 2-7）。

核酸分子的大小常用碱基数目（base 或 kilobase，用于单链 DNA 和 RNA）或碱基对数目（base pair，bp 或 kilobase pair，kbp，用于双链 DNA）来表示。小的核酸片段（<50bp）常被称为寡核苷酸（oligonucleotide）。自然界中的 DNA 和 RNA 的长度可以高达几十万个碱基。脱氧核糖和磷酸基团构成 DNA 的骨架（backbone），而 DNA 携带的遗传信息完全依靠碱基排列顺序变化。可以想象，一个由 N 个脱氧核苷酸组成的 DNA 会有 4^N 个可能的排列组合，提供了巨大的遗传信息编码潜力。



5' p-ApGpGpTpCpApApTpCpCpApG -OH 3'

5' AGGTCAA TCCAG 3'

AGGTCA ATCCAG

●图 2-7　核酸的一级结构及其书写方式

第二节　DNA 的空间结构与功能

构成 DNA 的所有原子在三维空间具有确定的相对位置关系，是 DNA 的空间结构（spatial structure）。DNA 的空间结构又分为二级结构（secondary structure）和高级结构。

一、DNA 的二级结构是双螺旋结构

（一）DNA 双螺旋结构的研究背景

1952 年，美国生物化学家 E. Chargaff 利用层析和紫外吸收光谱等技术研究了 DNA 的化学成分，提出了以下有关 DNA 中四种碱基组成的 Chargaff 规则：①腺嘌呤与胸腺嘧啶的摩尔数相等，而鸟嘌呤与胞嘧啶的摩尔数相等；②不同生物种属的 DNA 碱基组成不同；③同一个体不同器官、不同组织的 DNA 具有相同的碱基组成。表 2-2 列举了几种不同生物来源的 DNA 碱基摩尔含量组分。这一规则暗示了 DNA 的碱基 A 与 T、G 与 C 是以某种相互配对的方式存在的。

表 2-2　不同生物来源的 DNA 碱基组分和相对比例

	A	G	C	T	A/T	G/C	G+C	嘌呤/嘧啶
大肠杆菌	26.0	24.9	25.2	23.9	1.09	0.99	50.1	1.04
结核杆菌	15.1	34.9	35.4	14.6	1.03	0.99	70.3	1.00
酵母	31.7	18.3	17.4	32.6	0.97	1.05	35.7	1.00
牛	29.0	21.2	21.2	28.7	1.01	1.00	42.4	1.01
猪	29.8	20.7	20.7	29.1	1.02	1.00	41.4	1.01
人	30.4	19.9	19.9	30.1	1.01	1.00	39.8	1.01

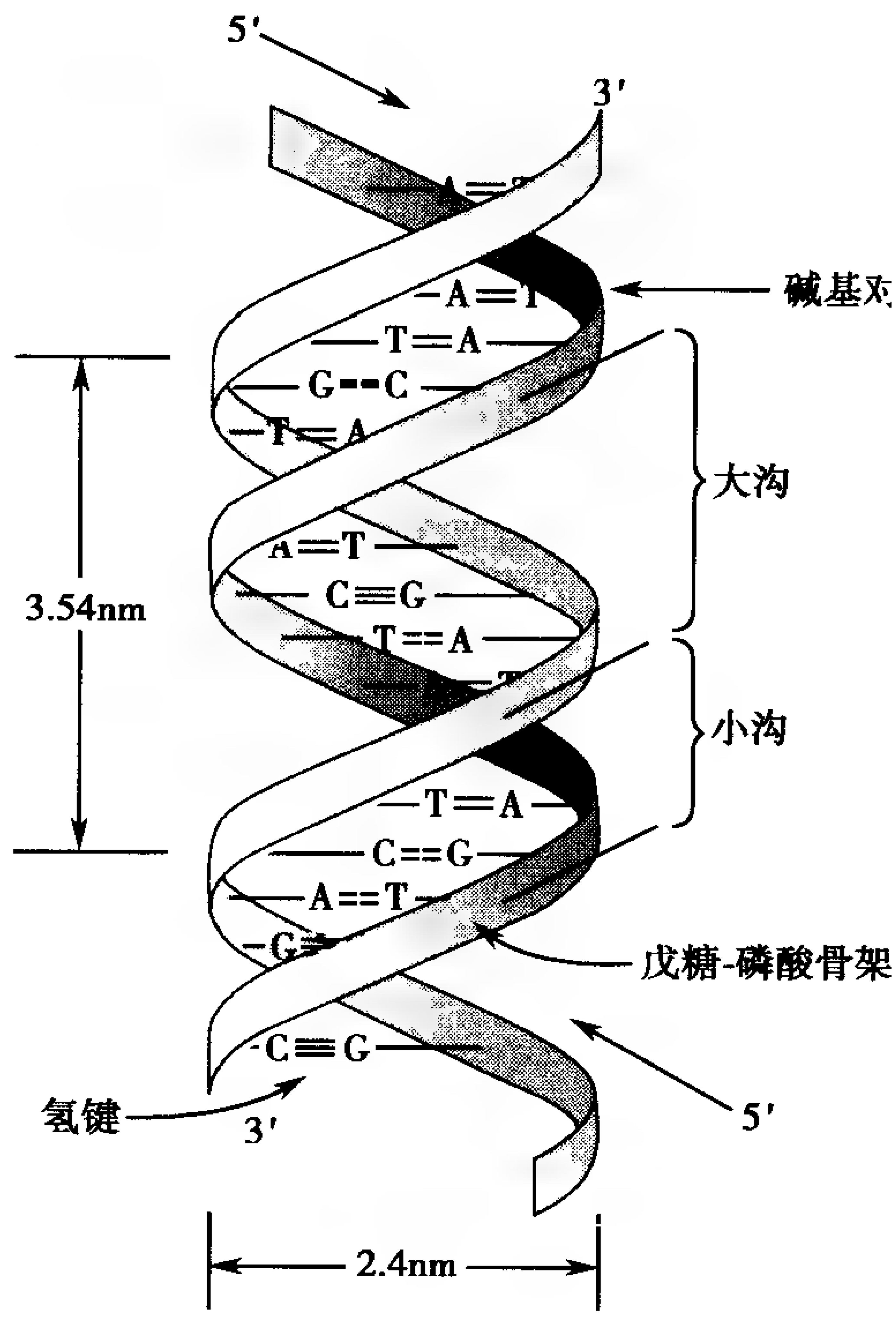
1951 年 11 月，英国的 M. Wilkins 和 R. Franklin 获得了高质量的 DNA 分子 X 线衍射照片。分析结果表明 DNA 是螺旋性分子，并且是以双链的形式存在的。综合了前人的研究结果，J. Watson 和 F. Crick 提出了 DNA 分子双螺旋结构（double helix）的模型，并在 1953 年将该模型发表在《Nature》杂志上。这一发现揭示了生物界遗传性状得以世代相传的分子机制，它不仅解释了当时已知的 DNA 的一切理化性质，而且还将 DNA 的功能与结构联系起来，奠定了现代生命科学的基础。

J. Watson 和 F. Crick

J. Watson 于 1950 年获动物学博士（印第安那大学），同年赴英国从事博士后研究。1951 年他第一次看到了由 M. Wilkins 拍摄的 DNA 分子的 X 线衍射图像后，激发了研究核酸结构的兴趣。而后他被安排在剑桥大学的 Cavendish 实验室里工作并在那里结识了 F. Crick。当时 F. Crick 正在攻读博士学位，其课题是利用 X 线衍射研究蛋白质分子的 α-螺旋结构。两人为揭示 DNA 空间结构的奥秘开始了密切的合作。根据 M. Wilkins 的高质量的 DNA 分子 X 线衍射图像和前人的工作，他们提出了 DNA 双螺旋结构的模型，并于 1953 年将其发表在《Nature》杂志上。DNA 双螺旋结构揭示了 DNA 作为遗传信息载体的物质本质，为 DNA 作为复制模板和基因转录模板提供了结构基础，将生物大分子的结构与功能的研究结合在一起。DNA 双螺旋结构的发现是生物学发展的里程碑，标志着现代分子生物学的开始。J. Watson、F. Crick 和 M. Wilkins 因此而分享了 1962 年的 Nobel 生理学和医学奖。

（二）DNA 双螺旋结构模型的要点

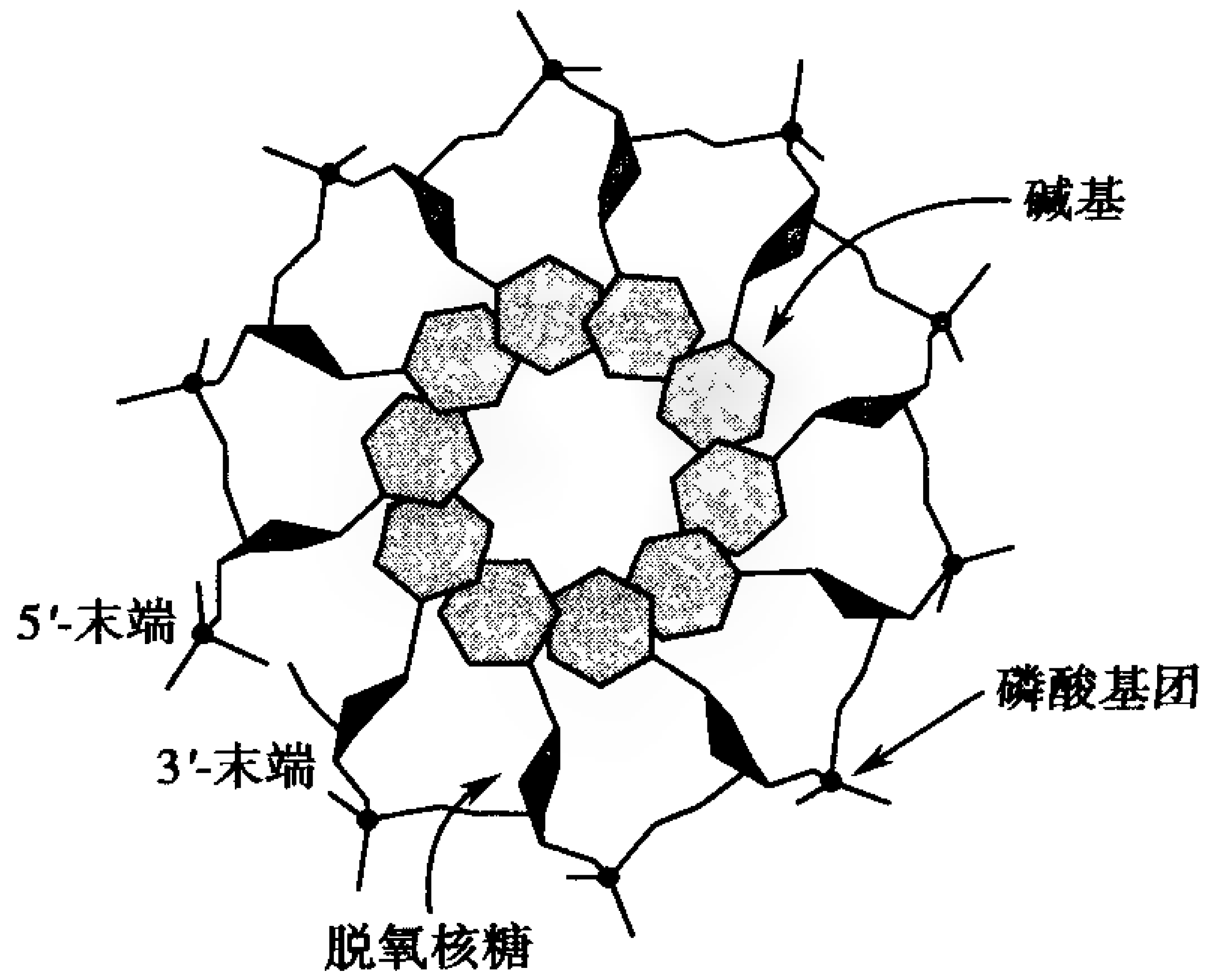
1. DNA 是反向平行、右手螺旋的双链结构　两条多聚核苷酸链在空间的走向呈反向平行（anti-parallel）。一条链的 5′→3′方向是从上向下，而另一条链的 5′→3′方向是从下向上。两条链围绕着同一个螺旋轴形成右手螺旋（right-handed helix）的结构（图 2-8）。DNA 双螺旋结构的直径为 2.37nm，螺距为 3.54nm。由脱氧核糖和磷酸基团组成的亲水性骨架（backbone）位于双螺旋结构的外侧，而疏水的碱基位于内侧（图 2-9）。从外观上看，DNA 双螺旋结构的表面存在一个大沟（major groove）和一个小沟（minor groove）。



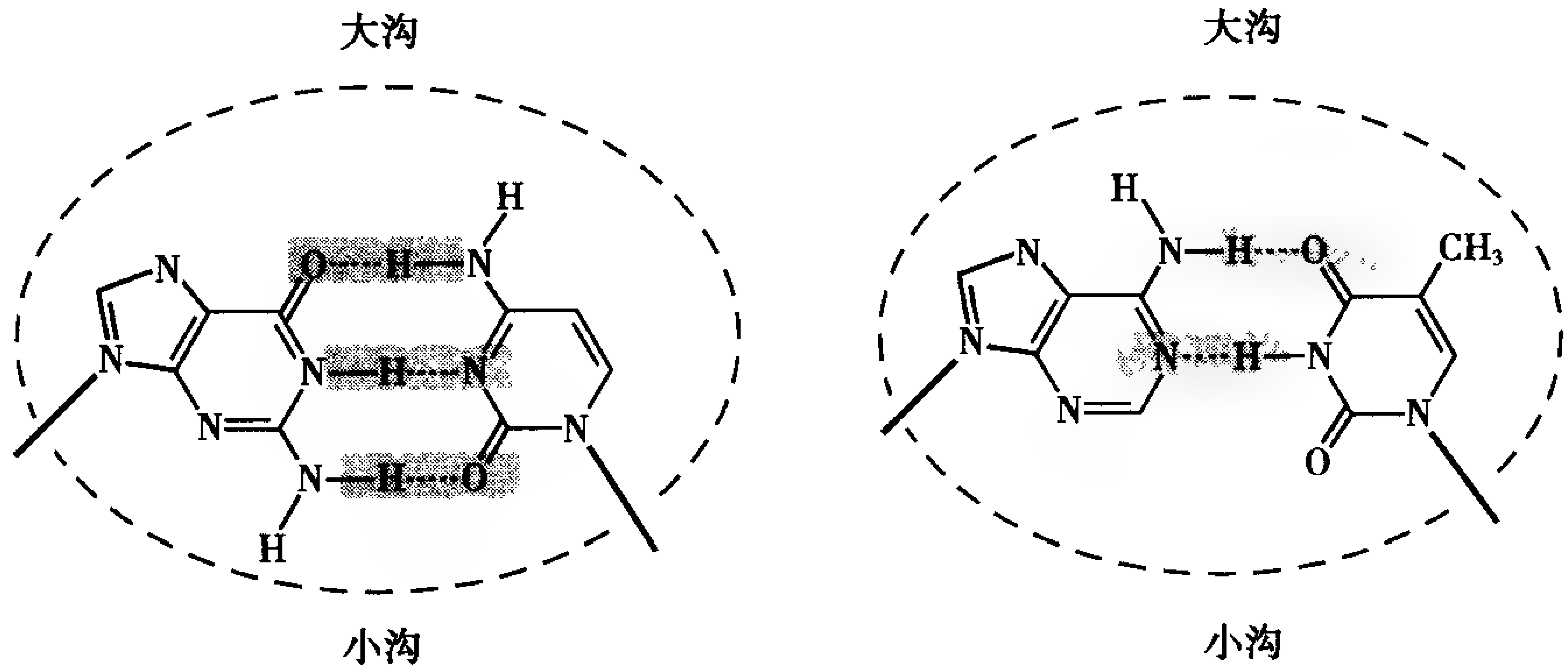
● 图 2-8　DNA 双螺旋结构的示意图
DNA 两条链的走向为反向平行，两条链围绕同一轴构成右手螺旋；两条链上的碱基形成了互补的碱基对

2. DNA 双链之间形成了互补碱基对　碱基的化学结构以及 DNA 双链的反向平行决定了两条链之间特有的相互作用方式：一条链上的腺嘌呤与另一条链上的胸腺嘧啶形成了两个氢键；一条链上的鸟嘌呤与另一条链上的胞嘧啶形成了三个氢键（图 2-10）。这种碱基配对关系称为互补碱基对（complementary base pair），DNA 的两条链则互为互补链（complementary strand）。碱基对平面与双螺旋结构的螺旋轴垂直。每一个螺旋有 10.5 个碱基对，每两个碱基对之间的相对旋转角度为 36°，每两个相邻的碱基对平面之间的垂直距离为 0.34nm。

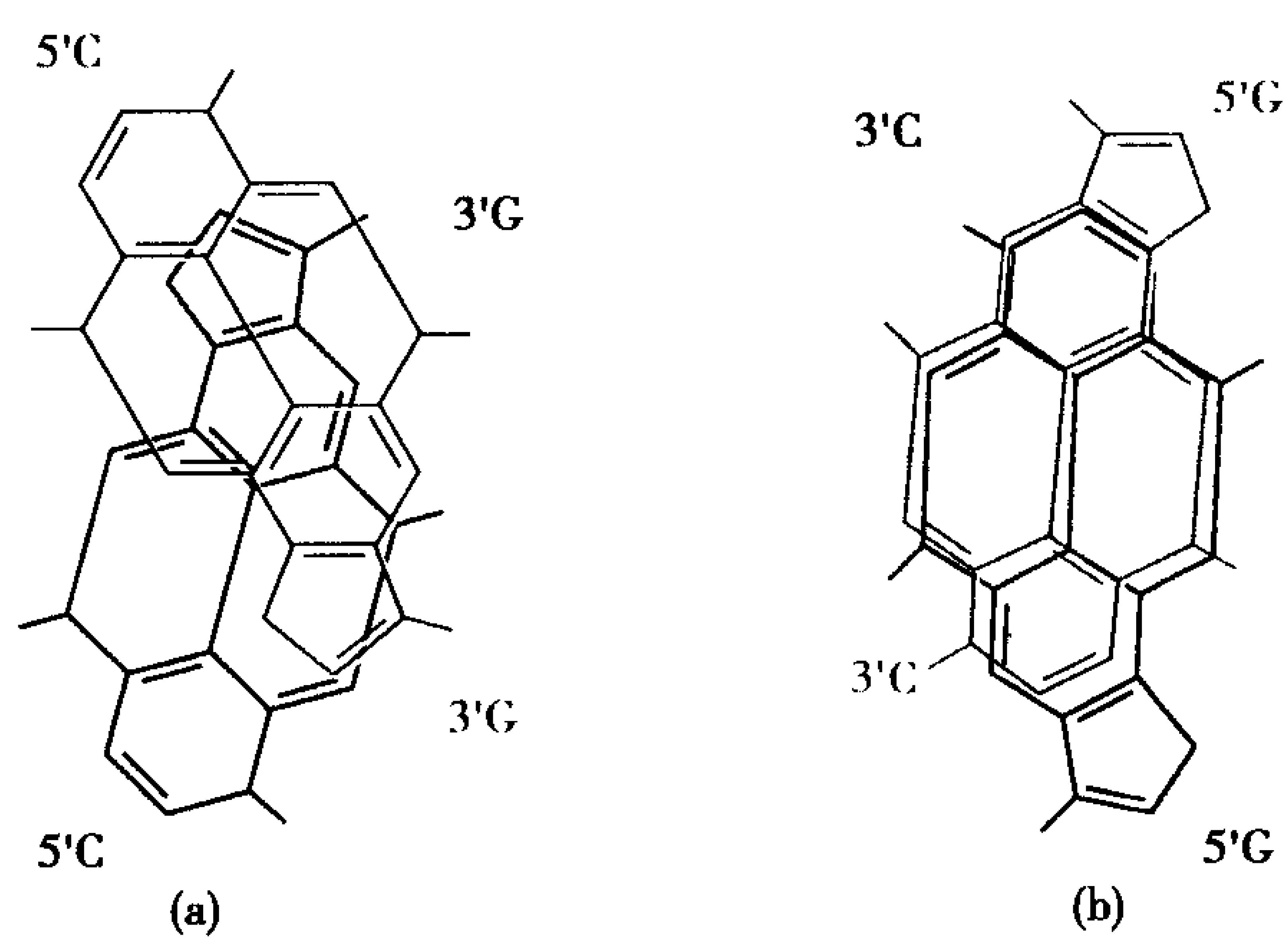
3. 疏水作用力和氢键共同维持着 DNA 双螺旋结构的稳定　相邻的两个碱基对平面在旋进过程中会彼此重叠（overlapping），由此产生了具有疏水性的碱基堆积力（base stacking interaction）（图 2-11）。这种碱基堆积力和互补链之间碱基对的氢键共同维系着 DNA 双螺旋结构的稳定，而且前者对于双螺旋结构的稳定更为重要。



●图 2-9　DNA 双螺旋结构的俯视图
为清晰起见，图中只显示了双链中的一条；脱氧核糖和磷酸基团构成的亲水性骨架位于双螺旋结构的外侧，而疏水的碱基位于内侧



●图 2-10　互补碱基对的形成
腺嘌呤与胸腺嘧啶通过两个氢键形成碱基对；鸟嘌呤与胞嘧啶通过三个氢键形成碱基对；反向平行的特点使得碱基对与磷酸骨架的连接呈非对称性，由此在双螺旋的结构中生成了一个大沟和一个小沟



●图 2-11　碱基堆积力的示意图
(a) 具有 CpG 序列的两个碱基对有较小的重叠（蓝色的是 5′末端的胞嘧啶）；(b) 具有 GpC 序列的两个碱基对有较大的重叠（蓝色的是 5′末端的鸟嘌呤），因此后者较前者更稳定

(三) DNA 双螺旋结构的多样性

Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构模型是基于在 92%相对湿度下得到的 DNA 纤维的 X 射线衍射图像的分析结果。这是 DNA 在水性环境下和生理条件下最稳定的结构。后来人们发现 DNA 的结构不是一成不变的，在改变了溶液的离子强度或相对湿度后，DNA 双螺旋结构的沟槽、螺距、旋转角度等都会发生变化。为便于区分，人们将 Watson 和 Crick 提出的双螺旋结构称为 B-DNA 或 B 型 DNA。当环境的相对湿度降低后，虽然 DNA 仍然是右手螺旋的双链结构，但是它的空间结构参数已不同于 B 型-DNA，人们将其称为 A 型-DNA（图 2-12）。尤其是在 1979 年，A. Rich 等人在研究人工合成的 CGCGCG 的晶体结构时竟意外地发现这种 DNA 具有左手螺旋（left-handed helix）的特征（图 2-12）。后来证明这种结构在天然 DNA 分子中同样存在，并称为 Z-DNA 或 Z 型-DNA。因此，DNA 的右手双螺旋结构不是自然界 DNA 的唯一存在方式。在生物体内，不同类型的 DNA 在功能上可能有所差异，与基因表达的调节和控制相适应。表征不同类型 DNA 的结构参数见表 2-3。



(a) (b) (c)

● 图 2-12 不同类型的 DNA 双螺旋结构

(a) B 型-DNA；(b) A 型-DNA；(c) Z 型-DNA

表 2-3 不同类型 DNA 的结构参数

	A 型-DNA	B 型-DNA	Z 型-DNA
螺旋旋向	右手螺旋	右手螺旋	左手螺旋
螺旋直径	2.55nm	2.37nm	1.84nm
每一螺旋的碱基对数目	11	10.4	12
螺距	2.53nm	3.54nm	4.56nm
相邻碱基对之间的垂直间距	0.23nm	0.34nm	0.38nm
糖苷键构象	反式	反式	嘧啶为反式，嘌呤为顺式，反式和顺式交替
相邻碱基对之间的转角	33°	36°	每个二聚体为-60°

续表

	A型-DNA	B型-DNA	Z型-DNA
使构象稳定的相对环境湿度	75%	92%	
碱基对平面法线与主轴的夹角	19°	1°	9°
大沟	窄深	宽深	相当平坦
小沟	宽浅	窄深	窄深

（四）DNA 的多链螺旋结构

在酸性溶液中，胞嘧啶的 N-3 原子被质子化，可与鸟嘌呤的 N-7 原子形成氢键，同时，胞嘧啶的 N-4 氢原子也可与鸟嘌呤的 O-6 形成氢键（图 2-13）。这种氢键被称为 Hoogsteen 氢键。Hoogsteen 氢键的形成并不破坏 Watson-Crick 氢键，这样就形成了 C^{+}GC 的三链结构（triplex），其中 GC 双链之间是以 Watson-Crick 氢键结合，而 C^{+}G 双链之间是以 Hoogsteen 氢键结合。同理，DNA 也可以形成 TAT 的三链结构。

真核生物 DNA 是线形分子，它的 3′-末端常是富含 GT 序列的多次重复，其重复度可达数十乃至数百。重复序列中的鸟嘌呤之间通过 Hoogsteen 氢键形成特殊的四链结构（tetraplex）（图 2-13）。

二、DNA 的高级结构是超螺旋结构

生物界的 DNA 是长度十分可观的大分子，如人体细胞中 23 对染色体的总长可达 2 米。因此，DNA 在形成双螺旋结构的基础上，在细胞内还要进一步盘绕和压缩，形成致密的结构组装在细胞核内。

DNA 双链可以盘绕形成超螺旋结构（superhelix 或 supercoil）。当盘绕方向与 DNA 双螺旋方向相同时，其超螺旋结构为正超螺旋（positive supercoil）；反之则为负超螺旋（negative supercoil）。DNA 的超螺旋结构是在拓扑异构酶参与下实现的。拓扑异构酶可以改变超螺旋结构的数量和类型。自然界的闭合双链 DNA 主要是以负超螺旋形式存在。

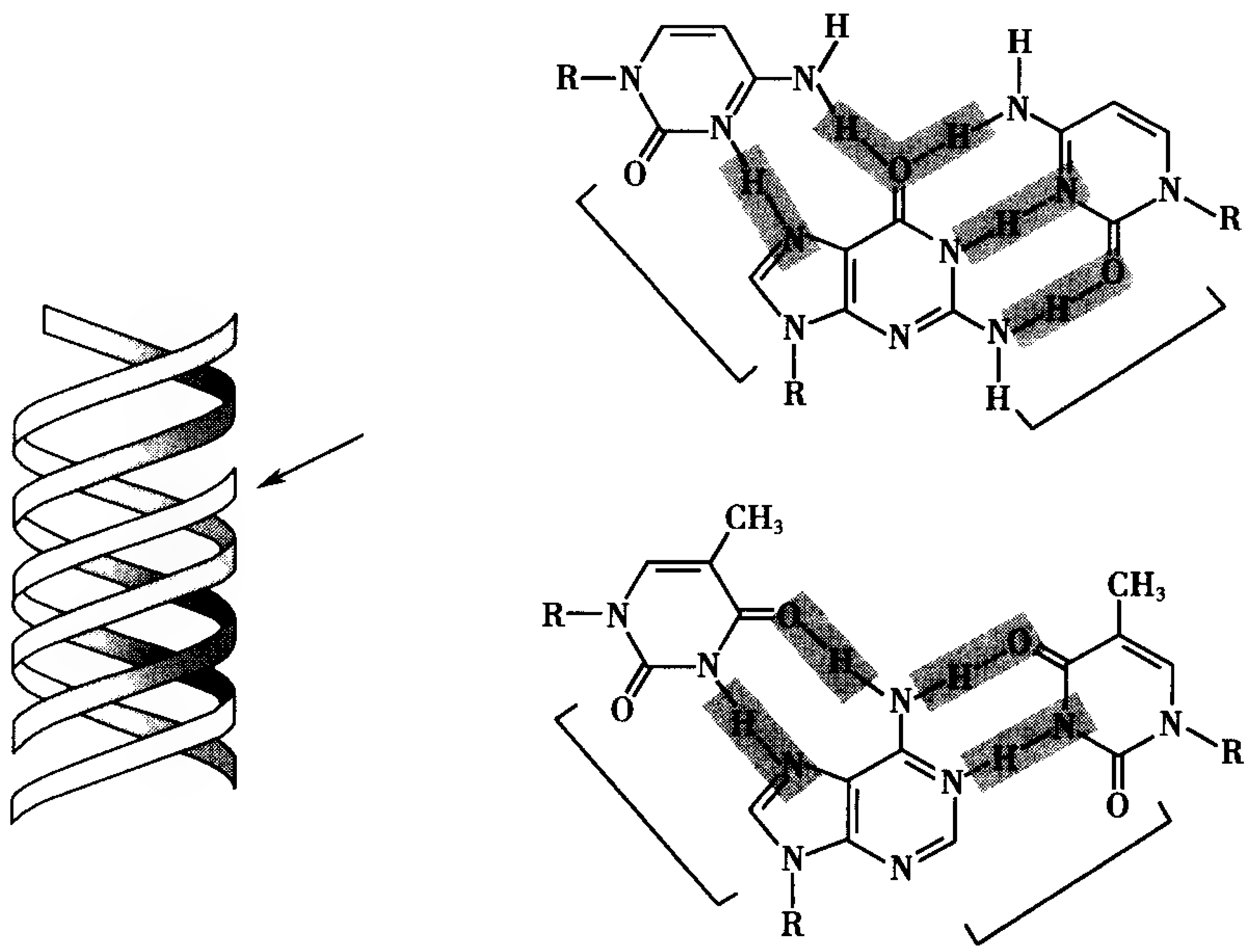
（一）原核生物 DNA 的环状超螺旋结构

绝大部分原核生物的 DNA 都是共价封闭的环状双螺旋分子。在细胞内进一步盘绕，并形成类核（nucleoid）结构，以保证其以较致密的形式存在于细胞内。类核结构中的 80%是 DNA，其余是蛋白质。在细菌 DNA 中，超螺旋可以相互独立存在，形成超螺旋区（图 2-14）。各区域间的 DNA 可以有不同程度的超螺旋结构。目前的分析表明，大肠杆菌的 DNA，平均每 200 个碱基就有一个负超螺旋形成。

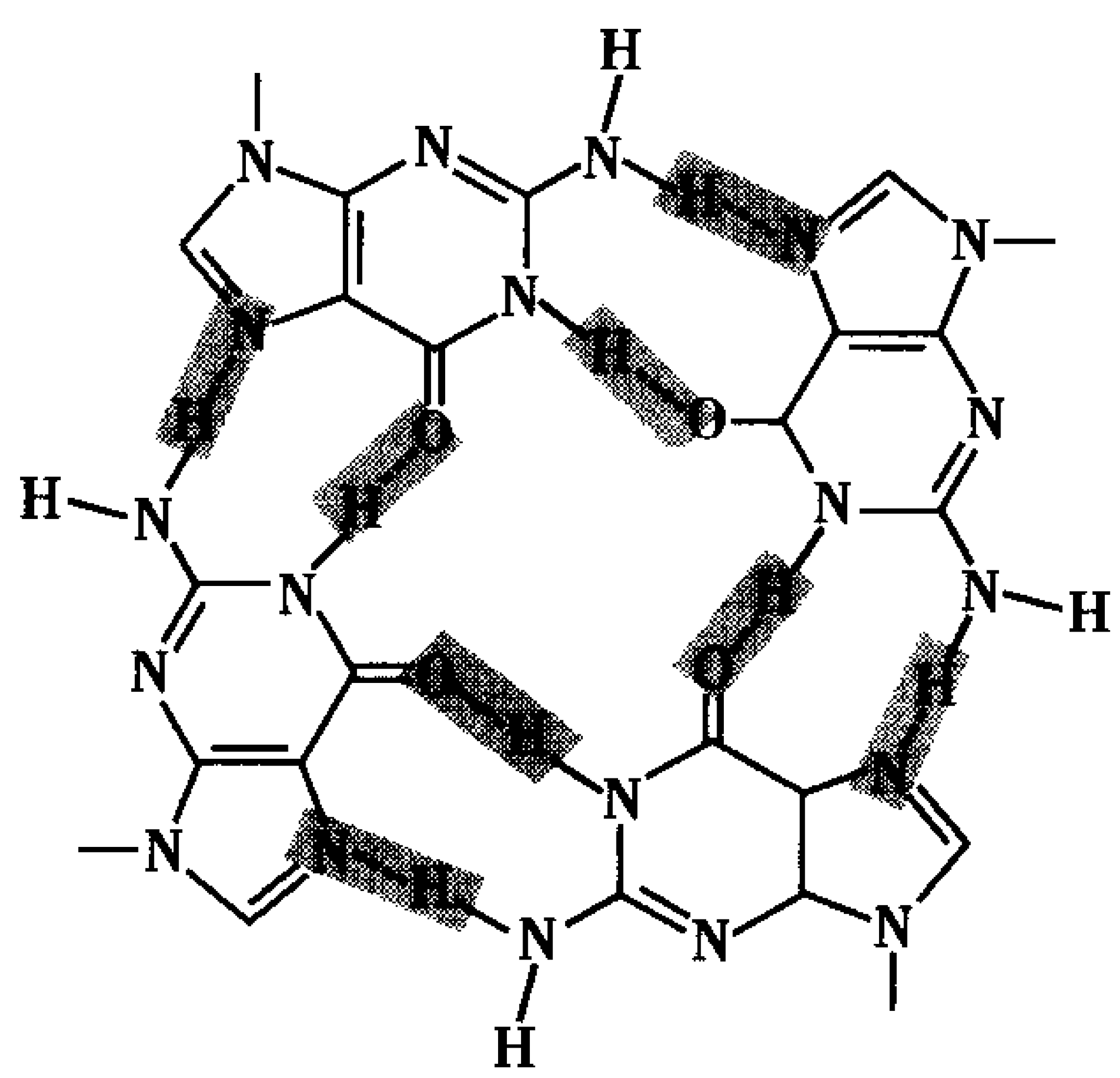
（二）真核生物 DNA 高度有序和高度致密的结构

真核生物的 DNA 以非常有序的形式存在于细胞核内。在细胞周期的大部分时间里以松散的染色质（chromatin）形式出现，在细胞分裂期形成高度致密的染色体（chromosome），可以在光学显微镜下观察到。处在这样一种致密结构中的 DNA 不但要完成复制和转录等复杂的生物过程，而且还要随时能够对自身进行监测和修复。可想而知，DNA 在真核生物细胞核内是处在一种极为复杂的动态变化之中。

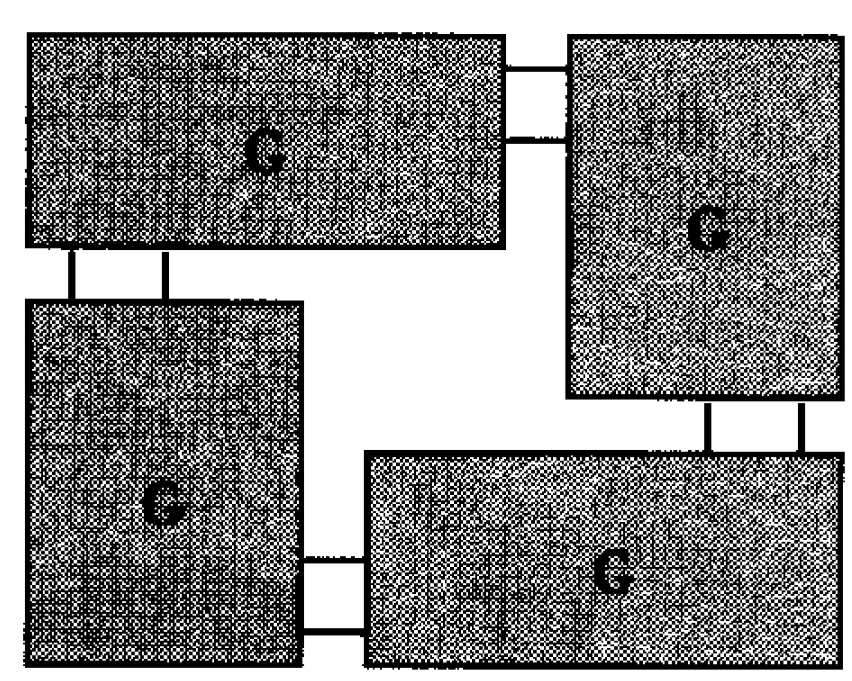
在电子显微镜下观察到的染色质具有串珠样的结构（图 2-15）。作为染色质基本组成单位的核小体（nucleosome）是由 DNA 和 5 种组蛋白（histone，H）共同构成的。两个分子的组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 分子构成八聚体的核心组蛋白。长度约 150bp 的 DNA 双链在组蛋白八聚体上盘绕 1.75 圈形成核小体的核心颗粒（core particle）。核心颗

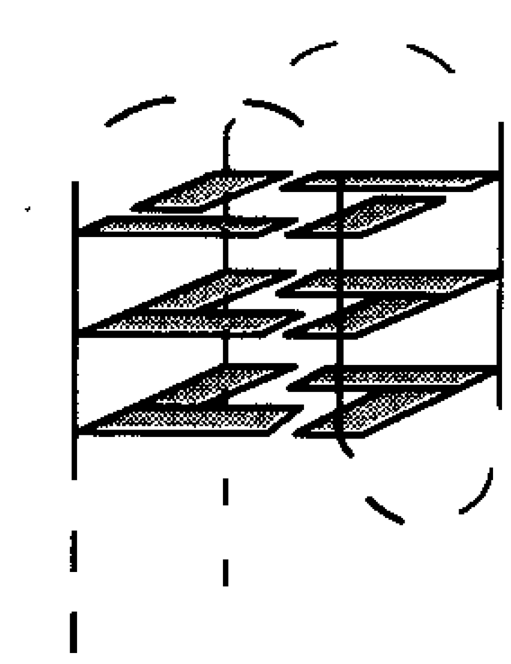


(a)



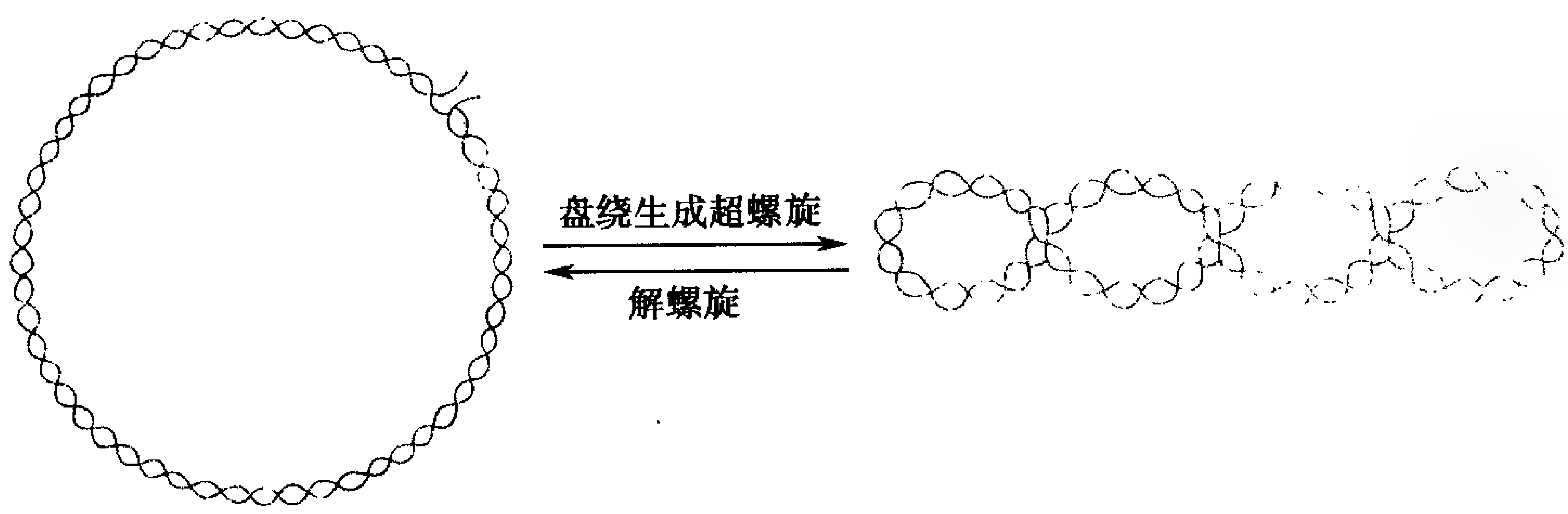
G-四链体





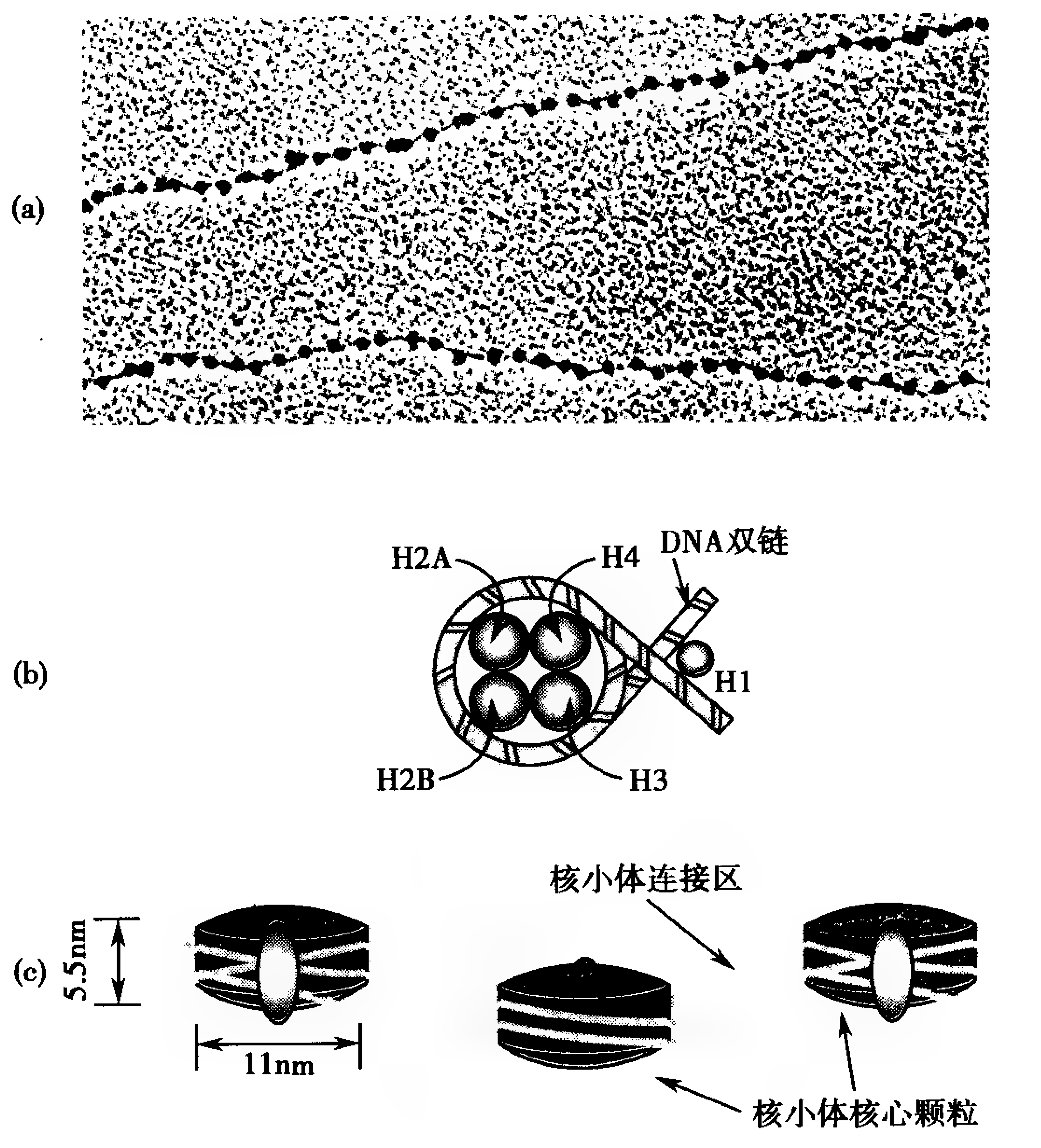
(b)

●图 2-13　DNA 的多链螺旋结构
（a）由 Watson Crick 氢键和 Hoogsteen 氢键共同构建的三链结构；
（b）由 Hoogsteen 氢键构成的四链结构



●图 2-14　封闭的环状 DNA 分子

在自然状态下表现出松弛的双链结构，在拓扑异构酶作用下形成超螺旋结构，两种结构处在动态平衡之中



●图 2-15　真核生物 DNA 形成核小体的示意图

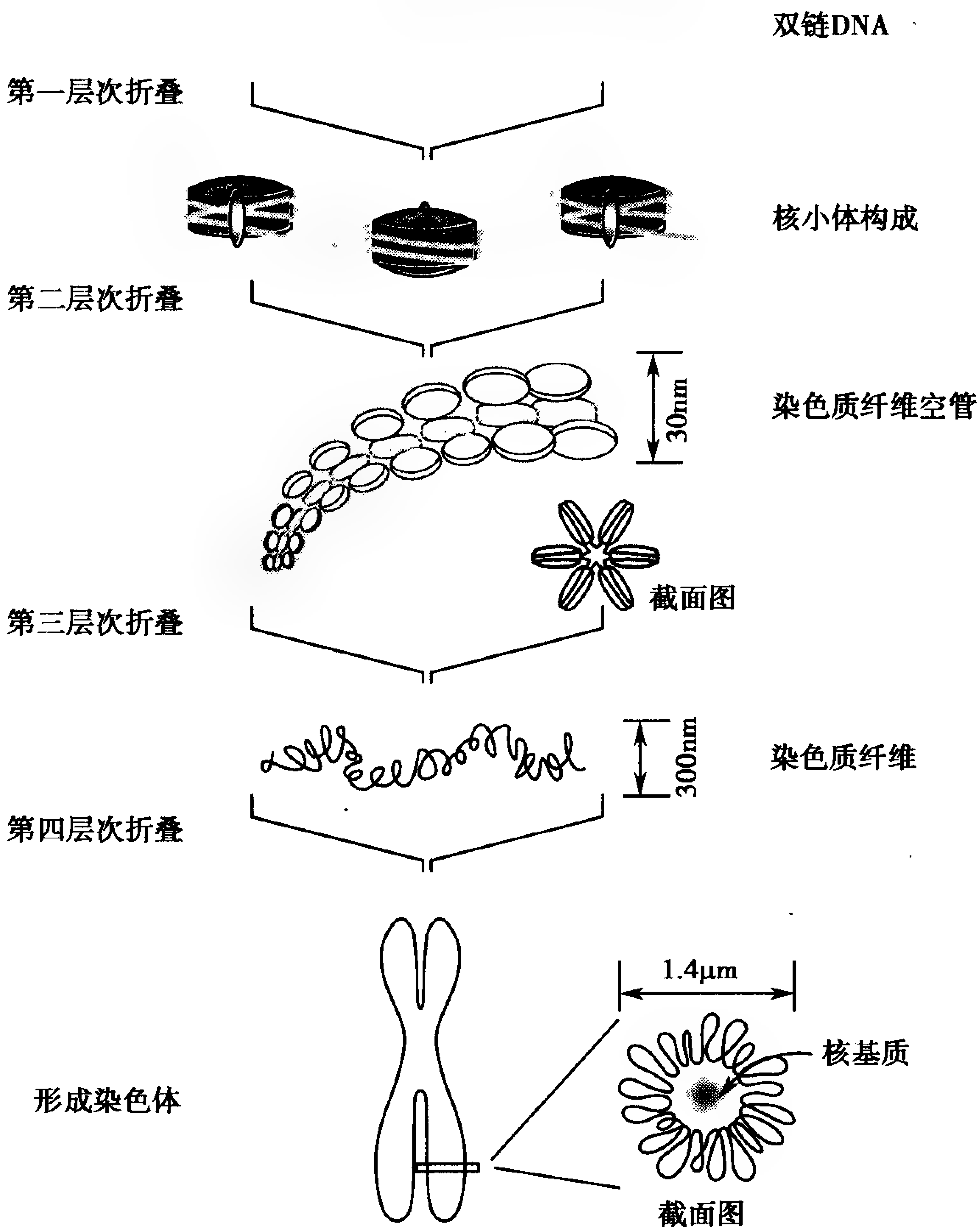
(a) 在电子显微镜图像下 DNA 染色质呈现的串珠样结构；(b) 核小体的核心颗粒结构，150bp 长的双链 DNA 盘绕在由组蛋白 H2A，H2B，H3 和 H4 构成的八聚体上；(c) 核小体的核心颗粒由 60bp 长的双链 DNA 连接在一起，形成串珠样的结构

粒是尺寸约 11nm×6nm 的盘状颗粒。核小体的核心颗粒之间再由 DNA（约 60bp）和组蛋白 H1 构成的连接区连接起来构成了串珠状的染色质细丝。这是 DNA 在核内形成致密结构的第一层次折叠，使 DNA 的体积压缩了 6～7 倍。

染色质细丝进一步盘绕形成外径为 30nm、内径为 10nm 的中空状螺线管（solenoid）。每圈螺旋由 6 个核小体组成。组蛋白 H1 位于螺旋管的内侧。染色质纤维空管的形成是 DNA 在核内形成致密结构的第二层次折叠，使 DNA 的体积又减少了约 6 倍。

染色质纤维空管进一步卷曲和折叠形成直径为 400nm 的超螺线管，这一过程将染色体的体积又压缩了 40 倍。之后，染色质纤维进一步压缩成染色单体，在核内组装成染色

体（图 2-16）。在分裂期形成染色体的过程中，DNA 被压缩了 8000～10000 倍，从而将近 2 米长的 DNA 有效地组装在直径只有数微米的细胞核中。整个折叠和组装过程是在蛋白质参与下精确调控的动态过程。



●图 2-16 双链 DNA 经历折叠、盘绕形成高度有序和高度致密染色体的示意图

三、DNA 是遗传信息的物质基础

人们早在 20 世纪 30 年代就已经知道了染色体是遗传物质，也知道了 DNA 是染色体的组成部分。但是直到 1944 年，O. Avery 才首次证明了 DNA 是细菌遗传性状的转化因子。他们利用从有荚膜的致病性的Ⅲ型肺炎球菌中提纯的 DNA 使另一种无荚膜的非致病性的Ⅱ型肺炎球菌细胞转变成了致病菌，而蛋白质和多糖物质没有这种功能。如果 DNA 被脱氧核糖核酸酶降解后，则失去转化功能。已经转化了的细菌，其后代仍保留了合成Ⅲ型荚膜的能力。这些结果证明了 DNA 是遗传的物质基础。

DNA 的遗传信息是以基因的形式存在的。基因(gene)是指 DNA 中的特定区段,其中的核苷酸排列顺序决定了基因的功能。DNA 是细胞内 DNA 复制和 RNA 合成的模板。DNA 的核苷酸序列以遗传密码的方式决定了蛋白质的氨基酸顺序(见第十二章)。依据这一原理,DNA 利用四种碱基的不同排列对生物体的所有遗传信息进行编码,经过复制遗传给子代,并通过转录和翻译确保生命活动中所需的各种 RNA 和蛋白质在细胞内有序合成。

一个生物体的基因组（genome）是它的全部遗传信息，即 DNA 的全部核苷酸序列。但有些病毒的基因组是 RNA。各种生物基因组的大小、结构、基因的种类和数量都是不同的。一般来讲，进化程度越高的生物体，其基因组越大越复杂，但并非完全如此。简单生物的基因组可能仅含几千个碱基对，而高等动物的基因组可高达 3×10^9 个碱基对，使可编码的信息量大大增加。

DNA 是生物遗传信息的载体，并为基因复制和转录提供了模板。它是生命遗传的物质基础，也是个体生命活动的信息基础。DNA 具有高度稳定性的特点，用来保持生物体系遗传的相对稳定性。同时，DNA 又表现出高度复杂性的特点，它可以发生各种重组和突变，适应环境的变迁，为自然选择提供机会。

人类基因组计划

1986 年 3 月，美国政府开始组织和讨论人类基因组计划（Human Genome Project，HGP）。该计划将对人类 23 对染色体的全部 DNA 进行测序，并绘制相关的遗传图谱、物理图谱和序列图谱。1988 年，美国国会正式批准 HGP，并任命 J. Watson 为项目总负责人。该计划于 1990 年正式启动。1992 年起，英、法、德、日等国相继加入该计划。我国于 1999 年跻身人类基因组计划，承担了 1%的测序任务。2001 年 2 月，设在美国国家卫生研究院的人类基因组国家研究中心与 Celera 公司联合公布了人类基因组序列草图。至此，人类历史上第一次由多个国家的数千名科学家参与的国际性科研合作项目宣告完成。中国作为参与这一计划的唯一发展中国家，虽然参加时间较晚，但是我国科学家提前两年完成了预定的任务，赢得了国际科学界的高度评价。

第三节 RNA 的结构与功能

如同 DNA 一样，RNA 在生命活动中具有同样重要的作用。目前已知，它和蛋白质共同负责基因的表达和表达过程的调控。RNA 通常以单链形式存在，但可以通过链内的碱基配对形成局部的双螺旋二级结构和空间的高级结构。RNA 比 DNA 小得多，从数十个核苷酸到数千个核苷酸长度不等。但是它的种类、大小和结构都远比 DNA 复杂的多，这与它的功能多样化密不可分（表 2-4）。

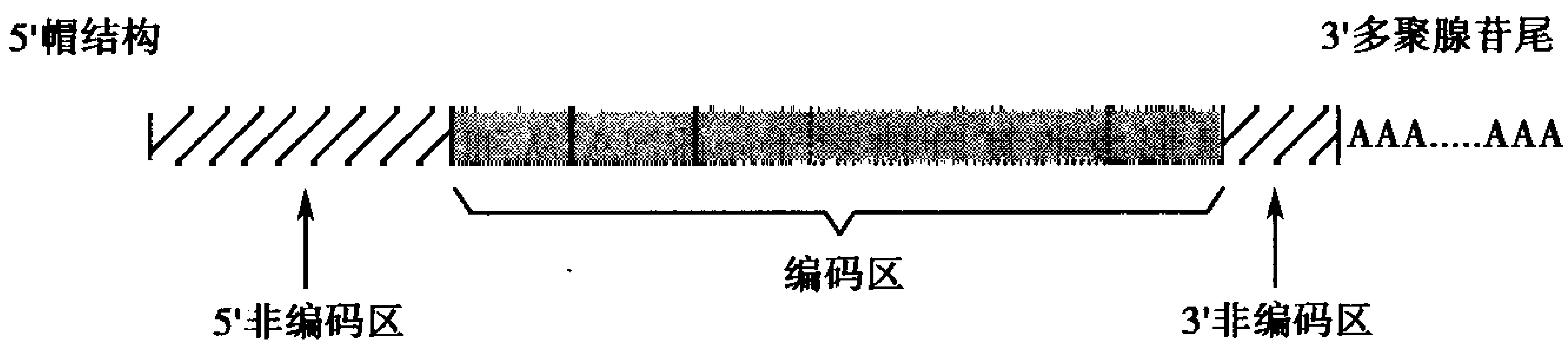
表 2-4 真核细胞内主要 RNA 的种类和功能

	细胞核和细胞液	线粒体	功 能
不均一核 RNA	hnRNA		成熟 mRNA 的前体
信使 RNA	mRNA	mt mRNA	合成蛋白质的模板
转运 RNA	tRNA	mt tRNA	转运氨基酸
核糖体 RNA	rRNA	mt rRNA	核糖体的组成部分
细胞内小 RNA			
核内小 RNA	snRNA		参与 hnRNA 的剪接和转运
核仁小 RNA	snoRNA		rRNA 的加工和修饰
胞质小 RNA	scRNA		蛋白质内质网定位合成的信号识别体的组成部分

一、mRNA 是蛋白质合成的模板

20 世纪 40 年代，科学家已经发现细胞质内蛋白质的合成速度与 RNA 水平相关。1960 年 F. Jacob 和 J. Monod 等人用放射性核素示踪实验证实，一类大小不一的 RNA 才是蛋白质在细胞内合成的模板。后来这类 RNA 又被确认为是在核内以 DNA 为模板合成的，然后转移至细胞质内。这类 RNA 被命名为信使 RNA（messenger RNA，mRNA）。

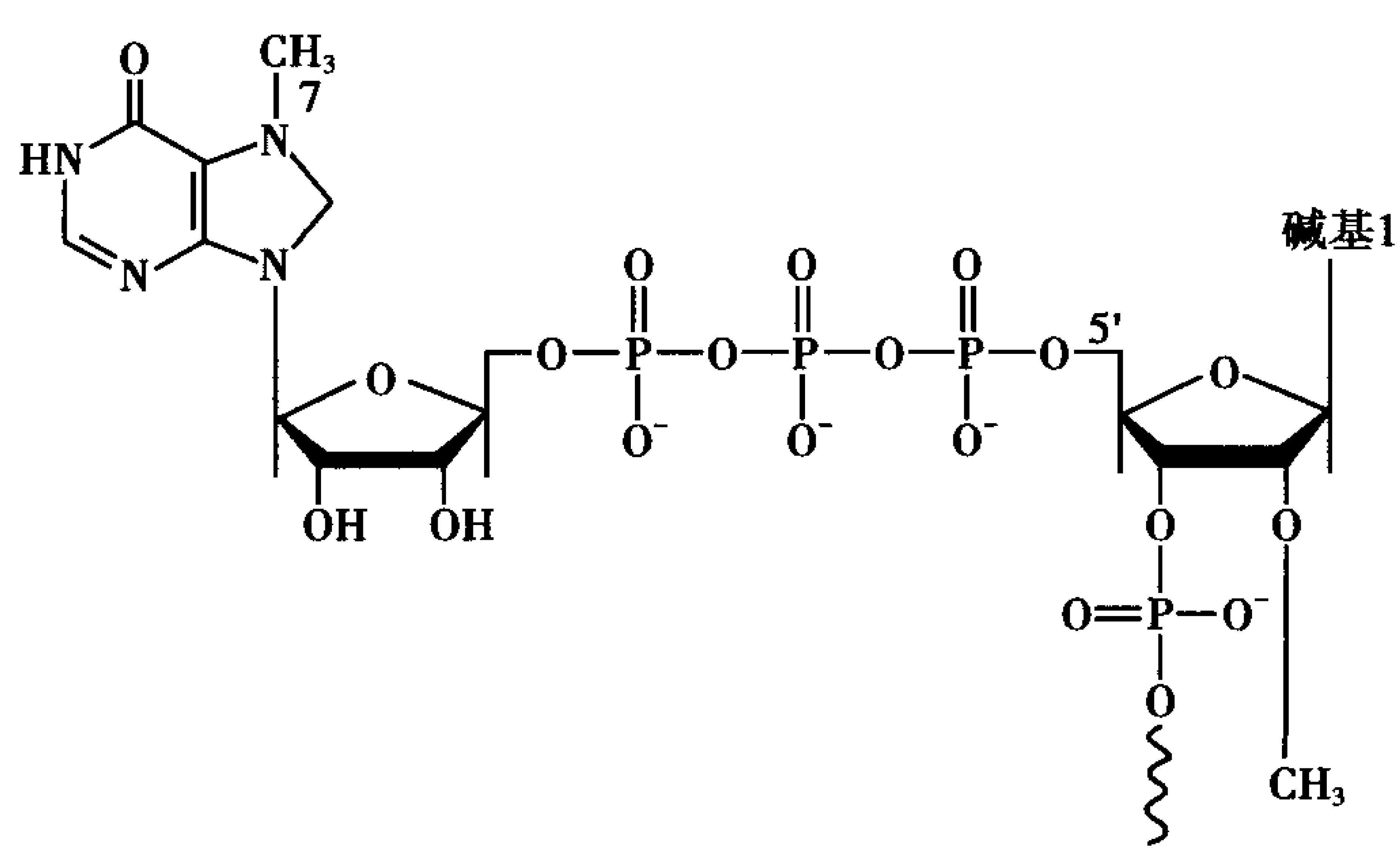
在细胞核内合成的 mRNA 初级产物比成熟的 mRNA 大得多，而且这种初级的 RNA 分子大小不一，故被称为不均一核 RNA（heterogeneous nuclear RNA，hnRNA）。hnRNA 在细胞核内存在时间极短，经过剪接成为成熟的 mRNA，并依靠特殊的机制转移到细胞质中。成熟的 mRNA 由氨基酸编码区和非编码区构成。真核生物 mRNA 的结构特点是含有特殊的 5′ 末端的帽结构和 3′-末端的多聚 A 尾结构（图 2-17）。原核生物 mRNA 没有这种结构。在生物体内，mRNA 的丰度最小，约占细胞总 RNA 的 2%～5%。但是 mRNA 的种类最多，约有 10^5 种之多。它们的大小也各不相同。在所有的 RNA 中，mRNA 的寿命最短，从几分钟到数小时不等。

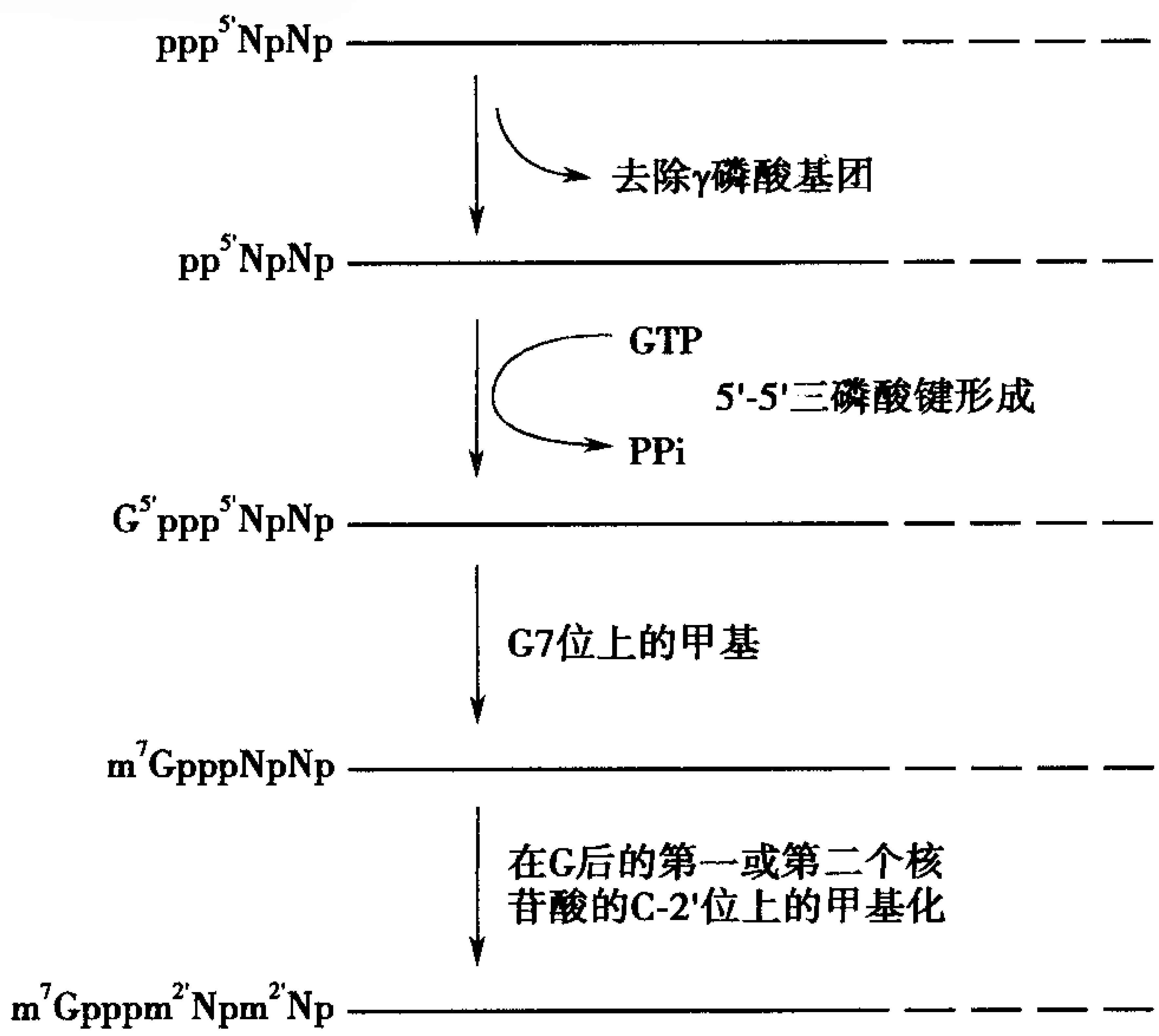


●图 2-17　成熟的真核生物 mRNA 的结构示意图

它由编码区和非编码区构成；编码区的前三个核苷酸序列是起始密码子 AUG，最后三个核苷酸序列是终止密码子 UAA（或 UAG 或 UGA）；成熟 mRNA 的 5′ 末端有帽结构，3′ 末端有多聚 A 尾结构

1. 大部分真核细胞 mRNA 的 5′-末端都以 7-甲基鸟嘌呤-三磷酸核苷（m^7GpppN）为起始结构　这种结构被称为帽结构（cap sequence）。5′-帽结构是由鸟苷酸转移酶加到转录后的 mRNA 分子上的，与 mRNA 中所有其他核苷酸呈相反方向，形成了 5′ 5′的连接特征，使得 mRNA 不再具有 5′-末端的磷酸基团。与帽结构的鸟苷酸相邻的第一个和第二个核苷酸中戊糖 C 2′通常也会被甲基化，由此产生数种不同的帽结构。mRNA 的帽结构以及加帽过程见图 2-18。





●图 2-18 真核生物 mRNA 的帽结构以及加帽过程

mRNA 的帽结构可以与一类称为帽结合蛋白（cap binding protein，CBP）的分子结合。这种由 mRNA 和 CBP 形成的复合物对于 mRNA 从细胞核向细胞质转运、与核糖体结合、与翻译起始因子结合以及 mRNA 稳定性的维持等均起到重要作用。

2. 在真核生物 mRNA 的 3′-末端，有一段由 80～250 个腺苷酸连接而成的多聚腺苷酸结构，称为多聚腺苷酸尾或多聚 A 尾［poly（A）tail］ 多聚 A 尾结构是在 mRNA 转录完成以后加入的，催化这一反应的酶是 poly（A）转移酶。多聚 A 尾结构在细胞内与 poly（A）结合蛋白［poly（A）-binding protein，PABP］结合，每 10～20 个腺苷酸结合一个 PABP 单体。所以，真核细胞 mRNA 的 3′-末端实际上是一个多聚 A 尾和蛋白质多聚体形成的复合物。目前认为，这种 3′-多聚 A 尾结构和 5′-帽结构共同负责 mRNA 从核内向细胞质的转位、维系 mRNA 的稳定性以及翻译起始的调控。去除 3′-多聚 A 尾和 5′-帽结构可导致细胞内的 mRNA 降解。mRNA 的加尾过程见图 2-19。

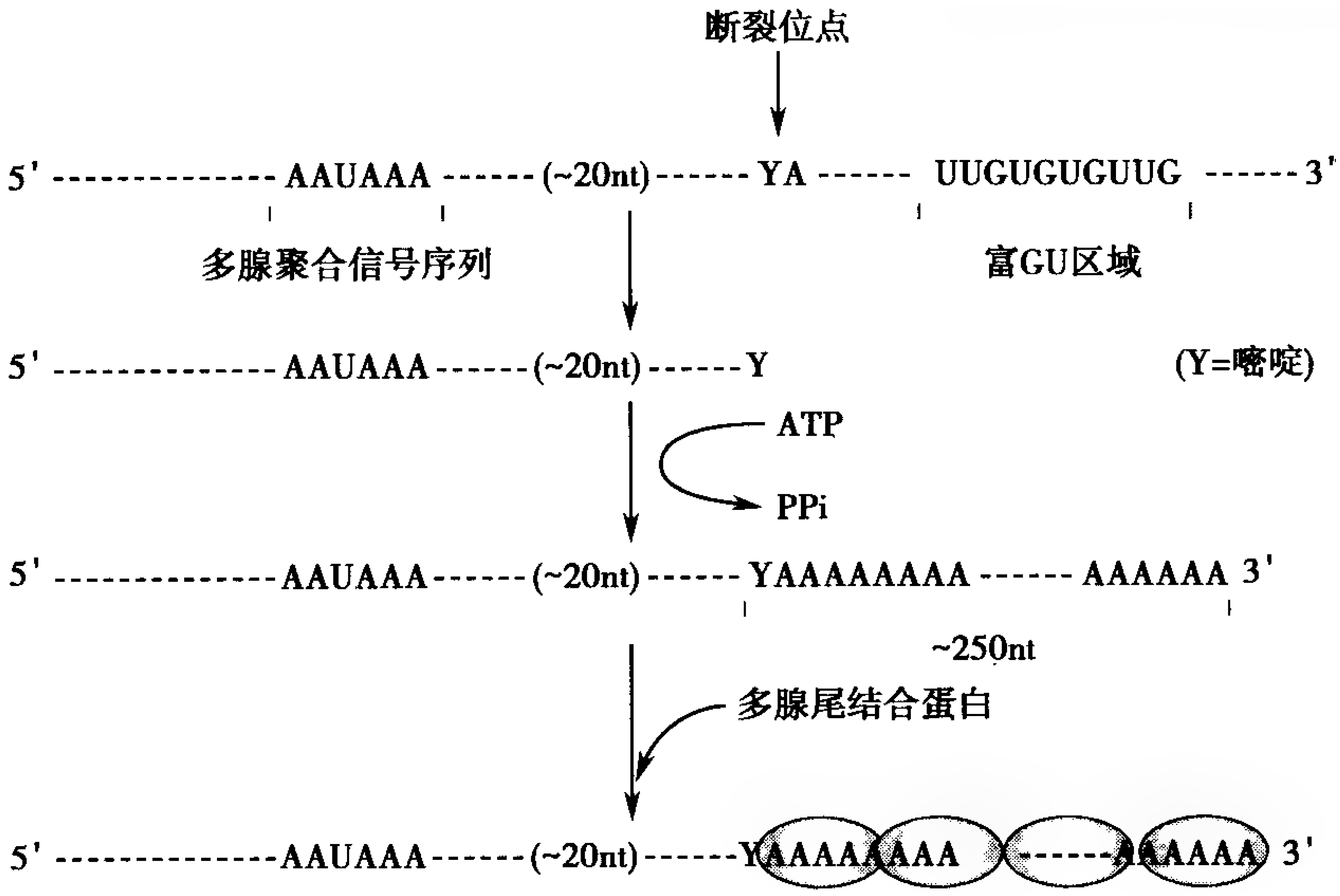
3. mRNA 依照自身的碱基顺序指导蛋白质氨基酸顺序的合成，也就是为蛋白质的生物合成提供模板 从 mRNA 分子 5′-末端起的第一个 AUG 开始，每 3 个核苷酸为一组定义了一个密码子（codon）或三联体密码（triplet code）。每一个密码子编码了一个氨基酸。AUG 被称为起始密码子。同理，决定肽链终止的密码子则称为终止密码子。位于起始密码子和终止密码子之间的核苷酸序列称为开放阅读框（open reading frame，ORF），决定了多肽链的氨基酸序列。

生物体各种 mRNA 链的长短差别很大，主要是由其转录的模板 DNA 区段大小及转录后的剪接方式所决定的。mRNA 的长短决定了它要翻译出的蛋白质的分子量大小。

4. mRNA 的成熟过程是 hnRNA 的剪接过程 比较 hnRNA 和成熟的 mRNA 发现前者的长度远远大于后者。hnRNA 含有许多外显子（exon）和内含子（intron），它们分别对应着基因的编码序列和非编码序列。在 mRNA 成熟过程中，这些内含子被剪切掉，使得外显子连接在一起，形成成熟的 mRNA（图 2-20）。

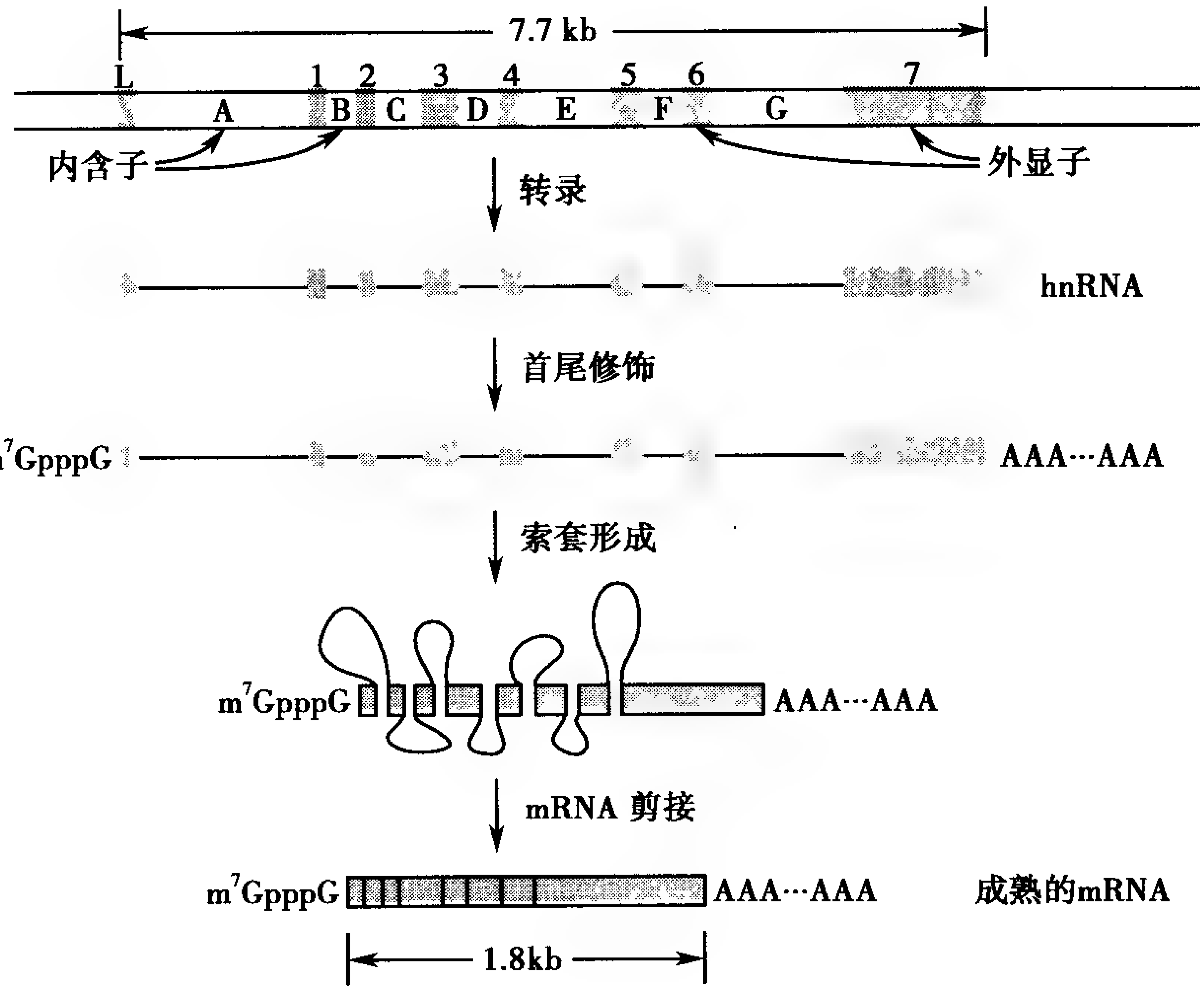
二、tRNA 是蛋白质合成的氨基酸载体

转运 RNA（transfer RNA，tRNA）的功能是在蛋白质生物合成中作为氨基酸的载



●图 2-19 真核生物 mRNA 多聚 A 尾结构的形成过程

当多聚 A 尾的信号序列出现时，在断裂位点以后的富 GU 区域被剪切掉，并逐一地将腺苷酸加在 3′-末端，形成多聚 A 尾结构，然后多聚 A 尾结合蛋白与多聚 A 尾结合

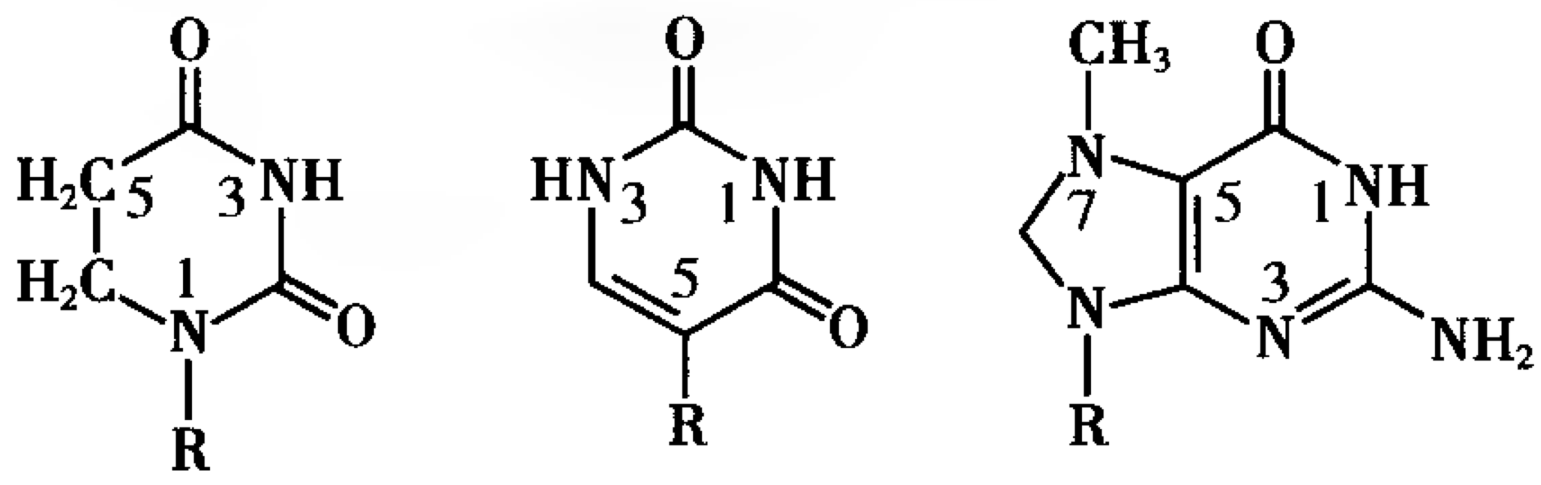


●图 2-20 鸡卵清蛋白 mRNA 的成熟过程

该基因有 8 个外显子（L 和 1-7）和 7 个内含子（A-G）；经过加帽、加尾和剪接修饰后，原来 7.7kb 长的基因变成了 1.8kb 长的 mRNA

体。tRNA 占细胞总 RNA 的 15%。已完成了一级结构测定的 100 多种 tRNA 都是由 74～95 个核苷酸组成的。tRNA 具有较好的稳定性。所有 tRNA 具有以下结构特点。

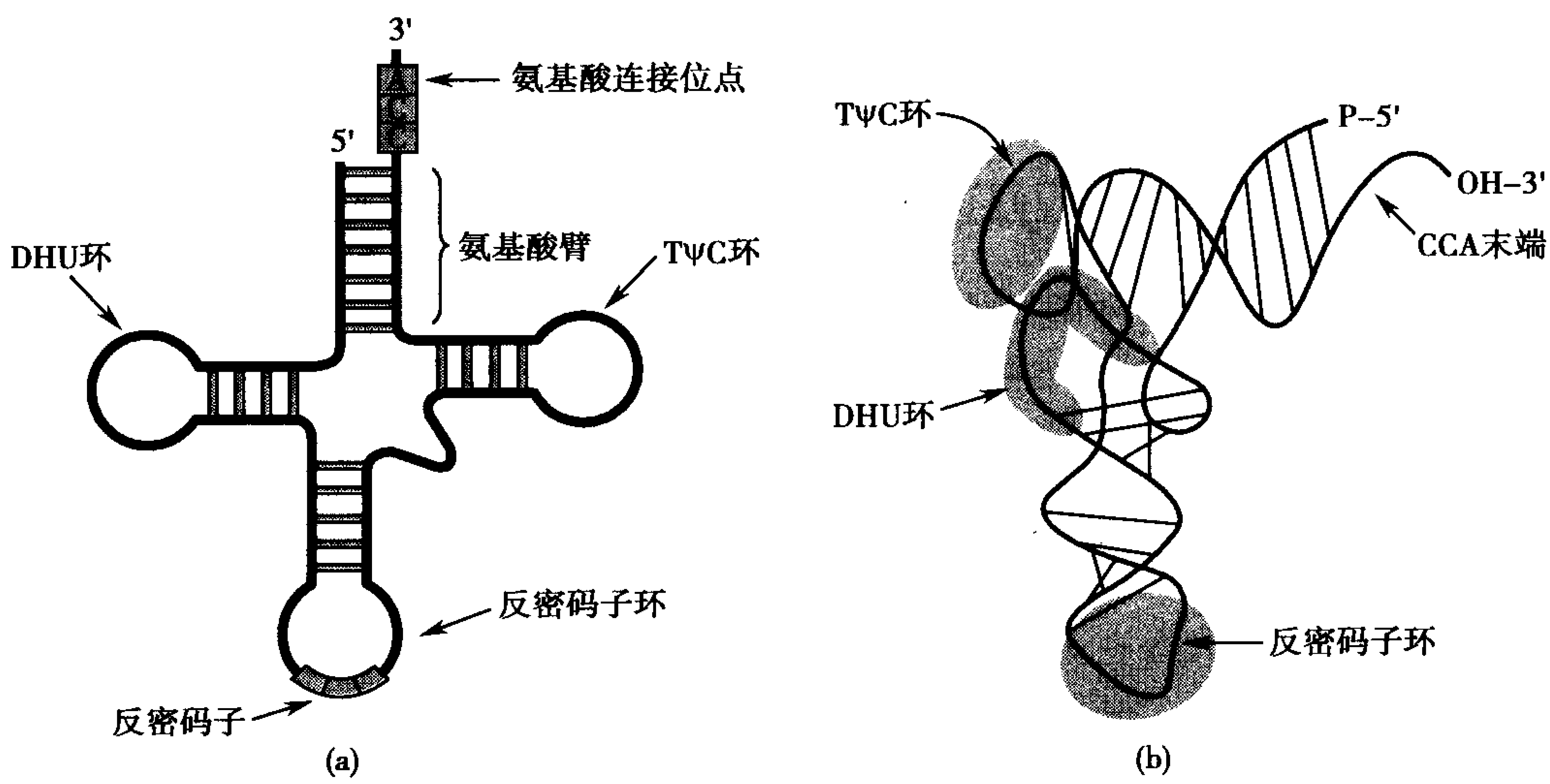
1. tRNA 含有多种稀有碱基 稀有碱基（rare base）是指除 A、G、C、U 外的一些碱基，包括双氢尿嘧啶（DHU）、假尿嘧啶核苷（pseudouridine，ψ）和甲基化的嘌呤（^{m}G，^{m}A）等（图 2-21）。正常的嘧啶是杂环的 N-1 原子与戊糖的 C-1′原子连接形成糖苷



●图 2-21　tRNA 分子中含有的稀有碱基

键，而假尿嘧啶核苷则是杂环的 C 5 原子与戊糖的 C-1′原子相连。tRNA 中的稀有碱基占所有碱基的 10%～20%。tRNA 分子中的稀有碱基均是转录后修饰而成的。

2. tRNA 具有茎环结构　tRNA 的核苷酸存在着一些能形成互补配对的区域，可以形成局部的双螺旋结构。这些局部的双链呈茎状，中间不能配对的部分则膨出形成环或襻状结构，称为茎环（stem-loop）结构或发夹（hairpin）结构。由于这些茎环结构的存在，使得 tRNA 的二级结构形似三叶草（cloverleaf）（图 2-22）。位于两侧的发夹结构以含有稀有碱基为特征，分别称为 DHU 环和 TψC 环。位于其上下则分别是接纳茎（acceptor stem）和反密码环（anticodon loop）。



●图 2-22　tRNA 的二级结构和三级结构

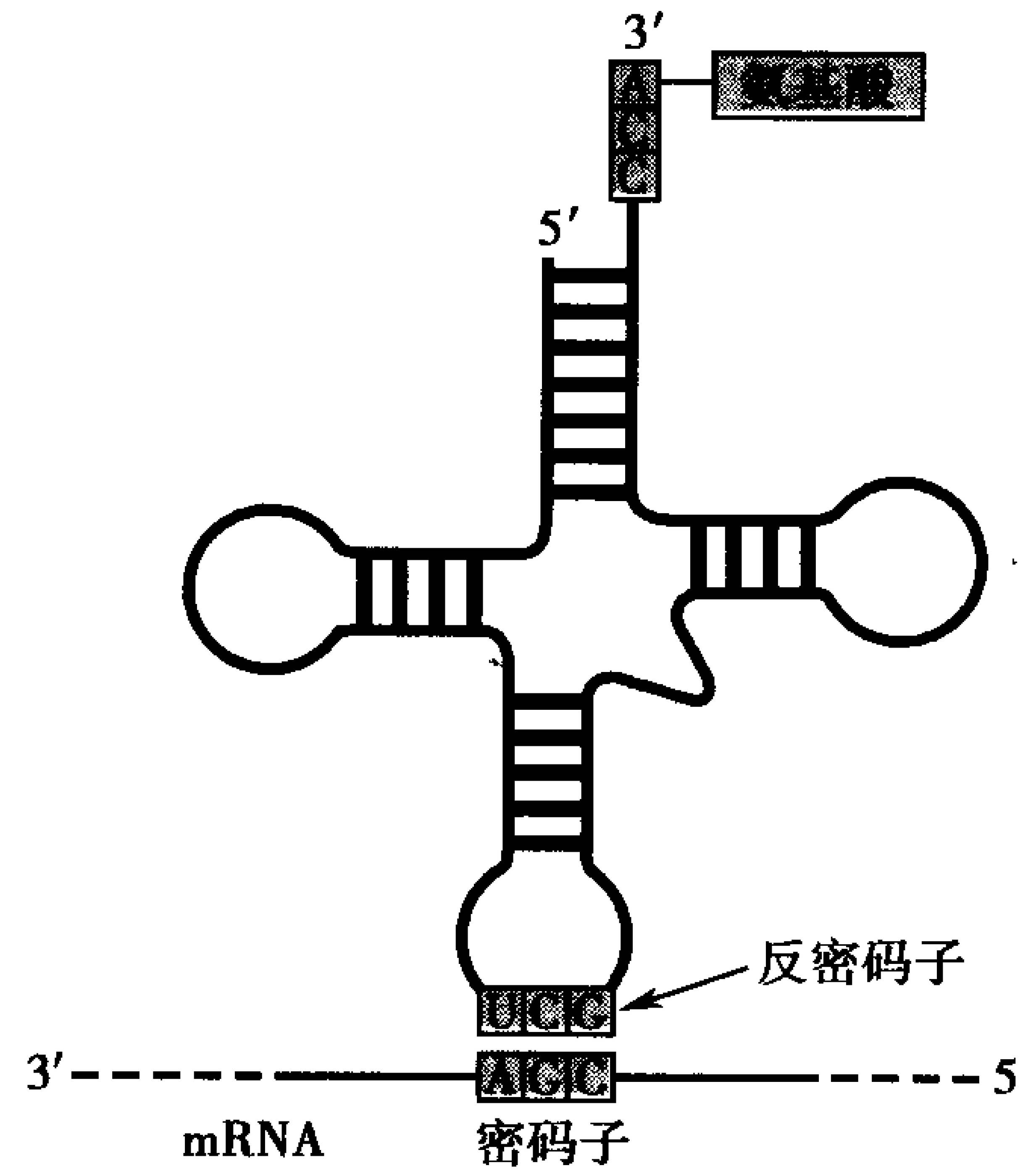
（a）tRNA 的二级结构形似三叶草，具有四个茎和三个环结构，其中 3′末端的腺苷酸 A 是氨基酸的连接位点；（b）tRNA 的三级结构是一个倒置的 L 形

X 线衍射图像分析表明，所有的 tRNA 具有共同的倒 L 形三级结构（图 2-22）。从 tRNA 的倒 L 形结构中可以看出：虽然 TψC 环与 DHU 环在三叶草形的二级结构上各处一方，但在三级结构上都相距很近。

3. tRNA 的 3′-末端连有氨基酸　所有 tRNA 的 3′-末端都是以 CCA 结束的，氨基酸可以通过酯键连接在 A 上，从而使得 tRNA 成为了氨基酸的载体。不同的 tRNA 可以结合不同的氨基酸。有的氨基酸只有一种 tRNA 作为载体，有的则需要数种 tRNA 作为载体，这是密码子的简并性原因。

4. tRNA 的反密码子能够识别 mRNA 的密码子　每个 tRNA 都有一个由 7～9 个核苷酸组成的反密码环。居中的 3 个核苷酸构成了一个反密码子。这个反密码子与 mRNA 的密码子通过碱基互补的关系相互识别。例如，携带酪氨酸的 tRNA 反密码子是 5′-GUA-

3′，可以与 mRNA 上编码酪氨酸的密码子 5′-UAC-3′互补配对。不同的 tRNA 有不同的反密码子。在蛋白质生物合成中，tRNA 反密码子依靠碱基互补的方式辨认 mRNA 的密码子，将其所携带的氨基酸正确地运送到蛋白质合成的场所（图 2-23）。



● 图 2-23　tRNA 的反密码子与 mRNA 的密码子相互识别的示意图

在蛋白质生物合成过程中，通过正确的碱基配对，mRNA 密码子与密码子所编码的氨基酸建立了一一对应的关系

三、以 rRNA 为组分的核糖体是蛋白质合成的场所

核糖体 RNA（ribosomal RNA，rRNA）是细胞内含量最多的 RNA，约占 RNA 总量的 80%以上。rRNA 与核糖体蛋白（ribosomal protein）共同构成核糖体（ribosome）。核糖体中的 rRNA 和核糖体蛋白共同为蛋白质生物合成所需要的 mRNA、tRNA 以及多种蛋白因子提供了相互结合和相互作用的空间环境。

原核生物有三种 rRNA，依照分子量的大小分为 5S、16S、23S（S 是大分子物质在超速离心沉降中的沉降系数）。它们分别与不同的核糖体蛋白质结合分别形成了核糖体的大亚基（large subunit）和小亚基（small subunit）（表 2-5）。真核生物的四种 rRNA 也利用同样的方式构成了核糖体的大亚基和小亚基。

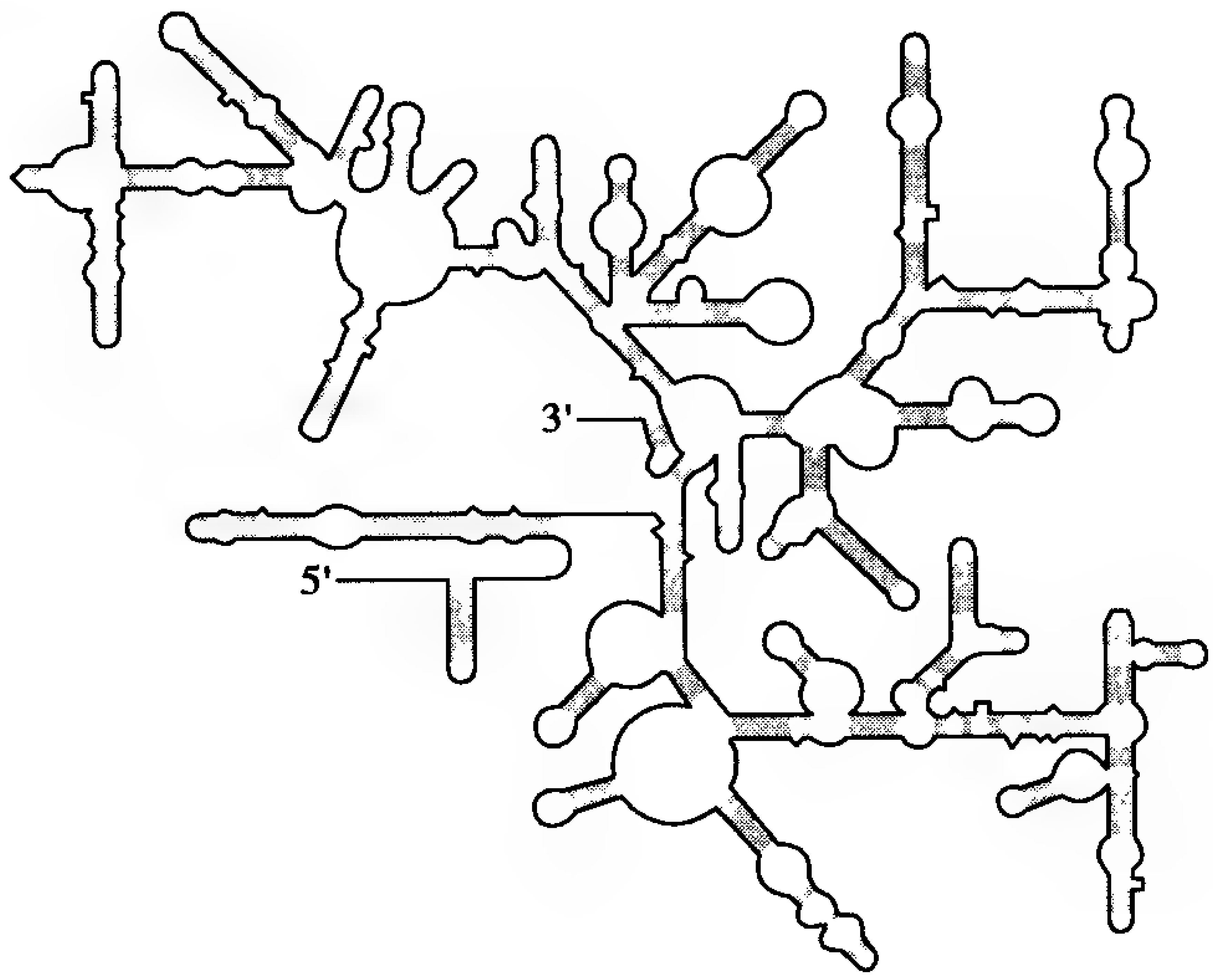
表 2-5　核糖体的组成

	原核生物（以大肠杆菌为例）		真核生物（以小鼠肝为例）	
小亚基	30S		40S	
rRNA	16S	1542 个核苷酸	18S	1874 个核苷酸
蛋白质	21 种	占总重量的 40%	33 种	占总重量的 50%
大亚基	50S		60S	
rRNA	23S	2940 个核苷酸	28S	4718 个核苷酸
	5S	120 个核苷酸	5.8S	160 个核苷酸
			5S	120 个核苷酸
蛋白质	31 种	占总重量的 30%	49 种	占总重量的 35%

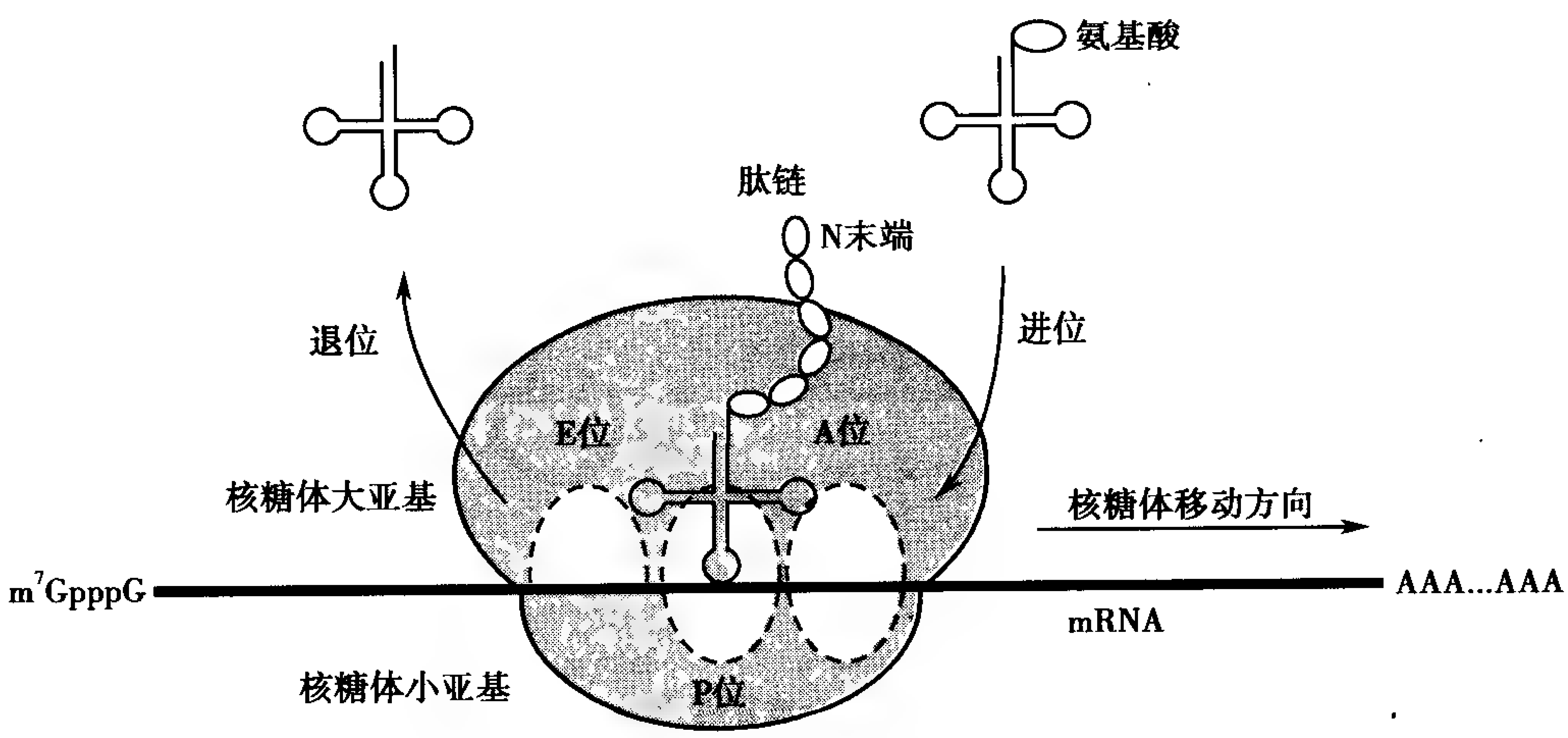
各种 rRNA 的核苷酸序列已经测定，并据此推测出了它们的二级结构和空间结构，如真核生物的 18S rRNA 的二级结构呈花状（图 2-24），众多的茎环结构为核糖体蛋白的结合和组装提供了结构基础。原核生物的 16S rRNA 的二级结构也极为相似。

将纯化的核糖体蛋白和 rRNA 在试管内混合，不需加入酶或 ATP 就可以自动组装成有活性的大亚基和小亚基。大亚基和小亚基进一步组装成核糖体。大小亚基之间的连接处是 mRNA 的结合部位。原核生物核糖体有三个重要的部位，它们分别是①A 位：结合氨基酰-tRNA 的氨基酰位（amino-oyl site）；②P 位：结合肽酰-tRNA 的肽酰位（peptidyl site）；③E 位：排出卸载了氨基酸的 tRNA 的排出位（exit site）（图 2-25）。

这三个部位为蛋白质生物合成提供了最基本的保证：①进位：在 A 位上接纳氨基酰-tRNA；②成肽：将 P 位上新生的肽链转呈给在 A 位上氨基酰-tRNA 的氨基酸，形成共价的酰胺键，将合成中的肽链在 C 末端增加了一个氨基酸；③转位：核糖体在 mRNA 链上



● 图 2-24 真核生物的 18S rRNA 的二级结构
众多的环茎结构为与蛋白质的相互作用提供了空间



● 图 2-25 由核糖体、mRNA 和 tRNA 形成的复合体
mRNA 结合在核糖体的大小亚基之间的缝隙中。核糖体的大小亚基形成了三个结合位点以接纳氨基酰-tRNA、保留肽酰-tRNA 和退掉卸载了氨基酸的 tRNA

向 3′-末端移动了三个核苷酸距离，使得 P 位上卸载了氨基酸的 tRNA 移到 E 位后排除掉，使得 A 位上的肽酰-tRNA 移到 P 位，使得 A 位腾空，准备接纳下一个氨基酰-tRNA。核糖体从 mRNA 的 5′-末端到 3′-末端的每三个核苷酸的移动，依次解读密码子，保证对应的 tRNA 正确进入 A 位，合成由遗传密码所决定的多肽链。真核生物核糖体没有 E 位，转位时卸载的 tRNA 直接从 P 位脱落。

四、snmRNA 参与了基因表达的调控

细胞内还有一类称之为非 mRNA 小 RNA（small non-messenger RNA，snmRNA）的 RNA。随着有关 snmRNA 的研究的深入和广泛，由此产生了 RNA 组学（RNomics）这一新的研究领域。RNA 组学的研究内容包括细胞中 snmRNA 的种类、结构和功能，同一生物体内不同种类的细胞或同一细胞在不同时空状态下 snmRNAs 表达谱的变化，以及

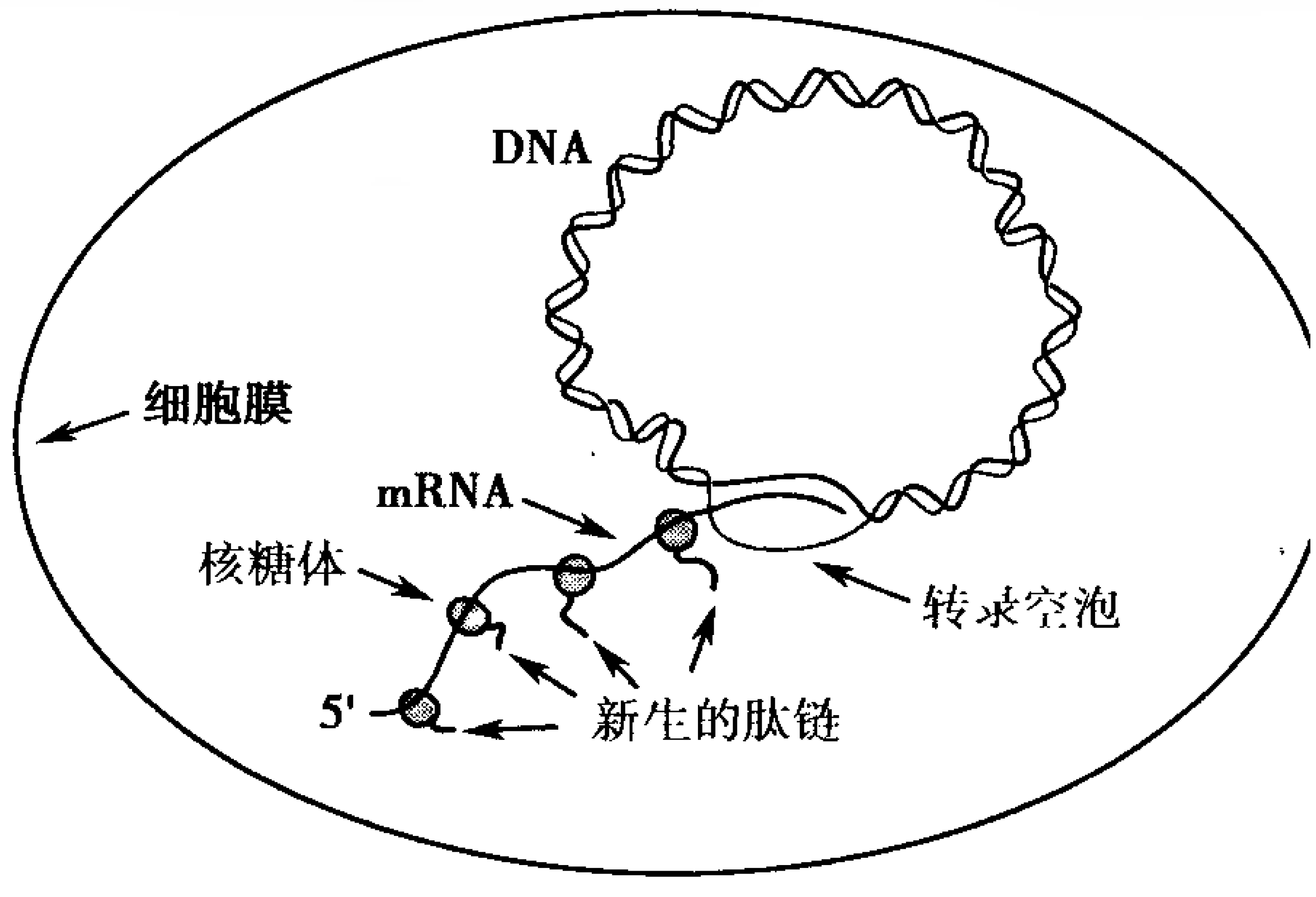
与功能之间的关系。

SnmRNAs 主要包括核内小 RNA（small nuclear RNA，snRNA）、核仁小 RNA（small nucleolar RNA，snoRNA）、胞质小 RNA（small cytoplasmic RNA，scRNA）、催化性小 RNA（small catalytic RNA）、小片段干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）等。这些小 RNA 在 hnRNA 和 rRNA 的转录后加工、转运以及基因表达过程的调控等方面具有非常重要的生理作用（见第十一和第十三章）。

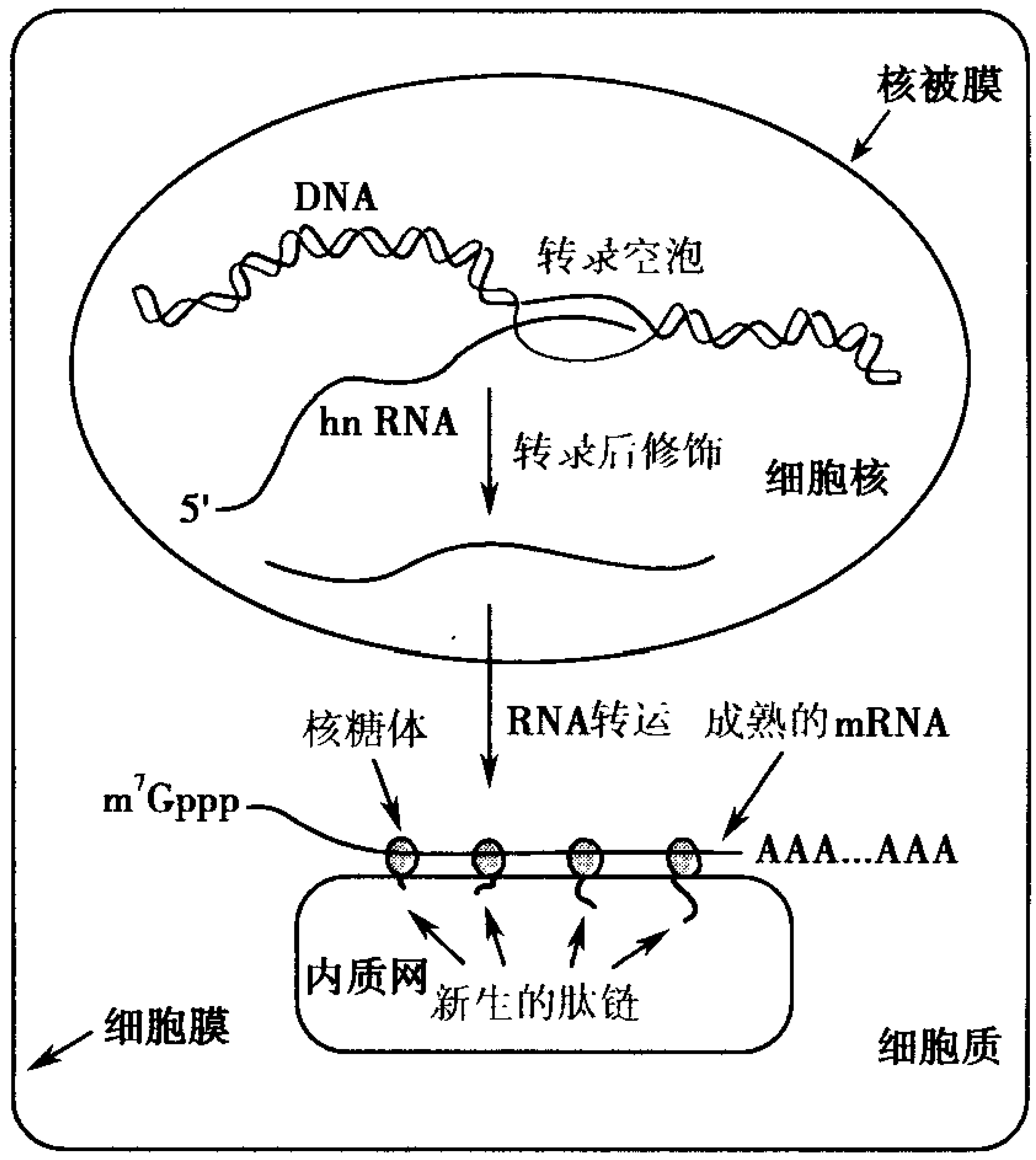
许多种 snRNA 参与了真核细胞 hnRNA 的加工剪接过程。研究比较清楚的有 U1、U2、U4、U5 和 U6。它们的作用是识别 hnRNA 上外显子和内含子的接点，将内含子切除。而 snoRNA则参与了 rRNA 中核糖 C-2′的甲基化修饰。

某些小 RNA 分子具有催化特定 RNA 降解的活性，在 RNA 合成后的剪接修饰中具有重要作用。这种具有催化作用的小 RNA 亦被称为核酶（ribozyme）或催化性 RNA（catalytic RNA）。T. Cech 和 S. Altman 两人由于这一发现而荣获 1989 年 Nobel 化学奖。

siRNA 是生物宿主对于外源侵入的基因所表达的双链 RNA 进行切割所产生的具有特定长度（21～23bp）和特定序列的小片段 RNA。这些 siRNA 可以与外源基因表达的 mRNA 相结合，并诱发这些 mRNA 的降解。利用这一机制发展起来的 RNA 干涉（RNA interference，RNAi）技术是用来研究基因功能的有力工具。由于发现了 siRNA 现象和发展了 RNAi 技术，A. Fire 和 C. Mello 荣获了 2006 年 Nobel 生理与医学奖。



(a)



(b)

●图 2-26 真核细胞和原核细胞基因表达的时空特异性
(a) 在原核细胞中，RNA 合成和蛋白质合成均在同一个空间内同时完成；(b) 在真核细胞中，由于核膜的存在，RNA 合成和蛋白质合成将在不同的空间内完成，并具有时间上的差异

五、核酸在真核细胞和原核细胞中表现了不同的时空特性

真核细胞和原核细胞的主要区别在于真核细胞具有核膜，这就决定了两种细胞在基因表达方式上的差异，以及 DNA 和 RNA 在这两种细胞中的不同定位。

原核细胞没有核膜，DNA 复制、RNA 生物合成（转录）和蛋白质生物合成（翻译）均在同一空间进行。当 mRNA 的 3′ 末端尚处在转录过程中，5′ 末端已经结合了核糖体，开始了蛋白质的生物合成（图 2-26）。

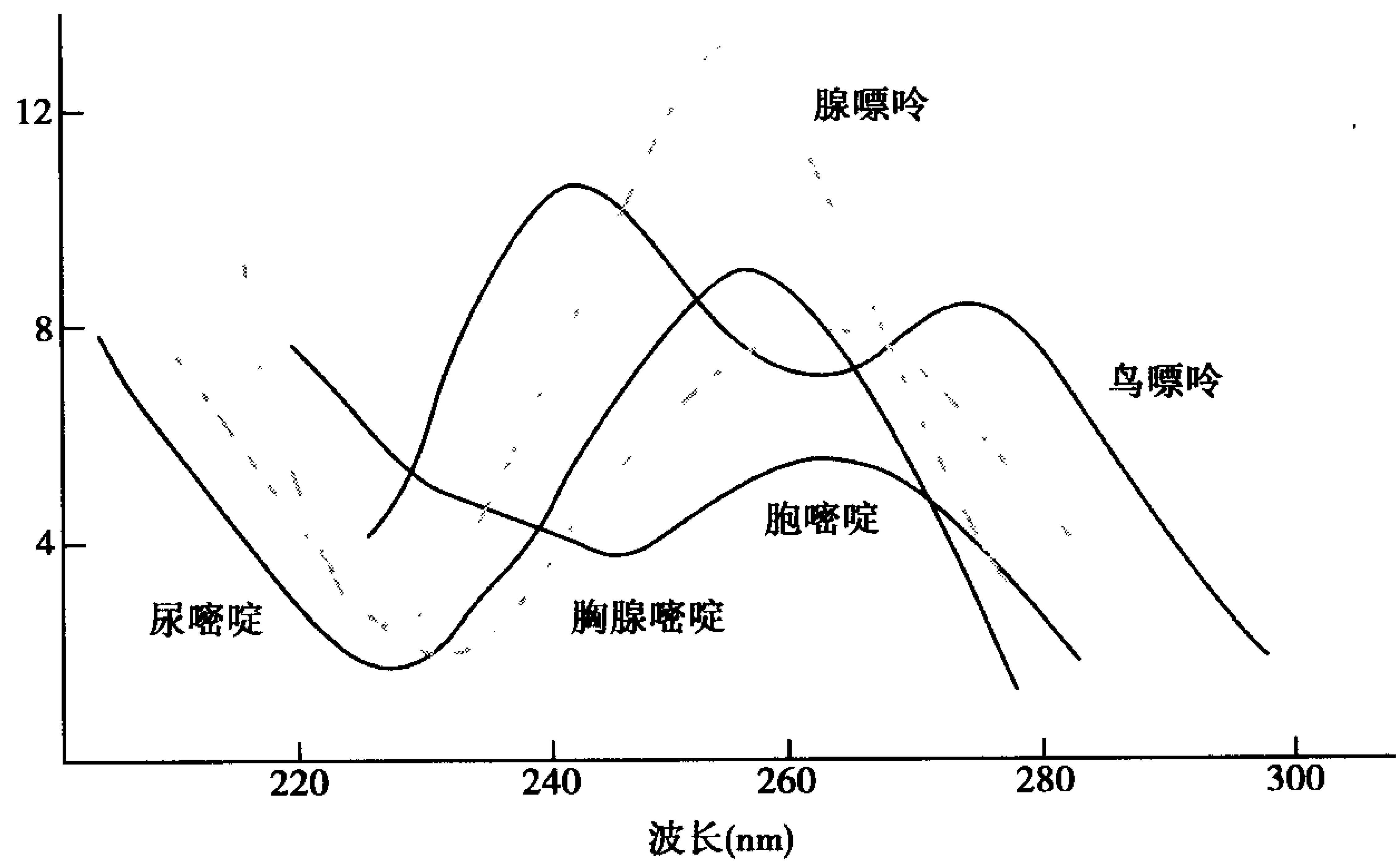
在真核细胞中，由于核膜的隔离，使得 RNA 转录和蛋白质生物合成在时间和空间上得以分开。RNA 转录是在细胞核内实现的，但是新生的 hnRNA 需要在细胞核内进行加工修饰后才能转运到细胞质中。成熟的 mRNA 在细胞质内指导和参与蛋白质的生物合成。

第四节 核酸的理化性质

核酸的化学成分和结构特征决定了它本身一些特殊的理化性质。这些理化性质被广泛用于基础研究及疾病诊断中。

一、核酸分子具有强烈的紫外吸收

嘌呤和嘧啶都含有共轭双键。因此，碱基、核苷、核苷酸和核酸在的紫外波段有较强烈的吸收。在中性条件下，它们的最大吸收值在 260nm 附近（图 2-27）。利用这一性质可以对核酸、核苷酸、核苷和碱基进行定性和定量分析。



● 图 2-27 五种碱基的紫外吸收光谱（pH 7.0）

根据在 260nm 处的吸光度（absorbance，A_{260}），可以计算出溶液中的 DNA 或 RNA 的含量。常以 $A_{260}=1.0$ 相当于 50μg/ml 双链 DNA、40μg/ml 单链 DNA 或 RNA 以及 20μg/ml 寡核苷酸为计算标准。利用 260nm 与 280nm 的吸光度比值（A_{260}/A_{280}）还可以判断核酸样品的纯度，纯 DNA 样品的 A_{260}/A_{280} 应为 1.8；而纯 RNA 样品的 A_{260}/A_{280} 应为 2.0。

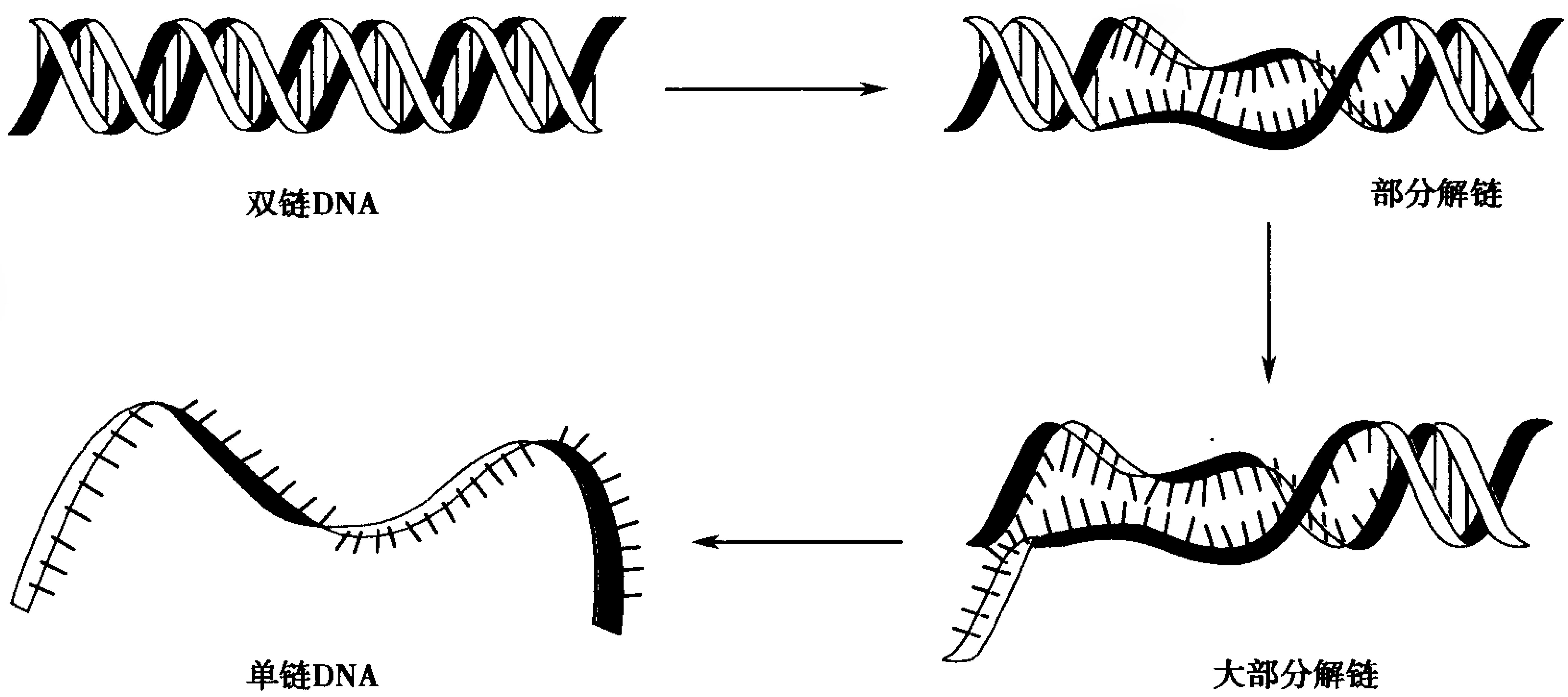
核酸为多元酸，具有较强的酸性。DNA 是线性高分子，因此溶液的黏滞度极大，而 RNA 远小于 DNA，溶液的黏滞度也小得多。DNA 在机械力的作用下易发生断裂，为基因组 DNA 的提取带来一定困难。

溶液中的核酸分子在引力场中可以下沉。在超速离心形成的引力场中，具有不同构象的核酸分子的沉降速率有很大差异，如环状、线性、开环和超螺旋等。这是超速离心法提取和纯化核酸的理论基础。

二、DNA 变性是双链解离为单链的过程

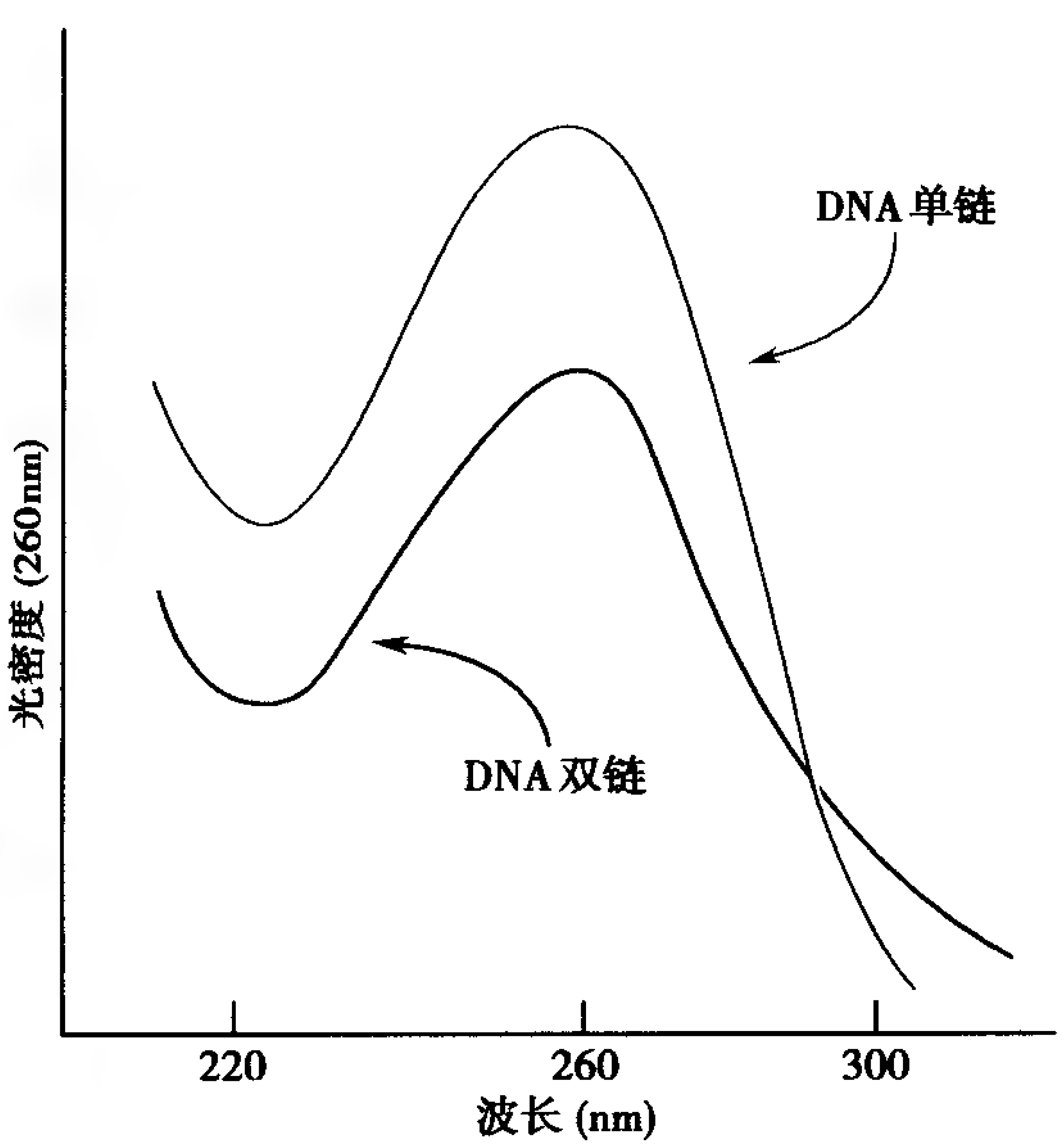
某些理化因素（温度、pH、离子强度等）会导致 DNA 双链互补碱基对之间的氢键发生断裂，使双链 DNA 解离为单链。这种现象称为 DNA 变性。DNA 变性只改变其二级结构，不改变它的核苷酸序列（图 2-28）。

在 DNA 解链过程中，由于有更多的共轭双键得以暴露，DNA 在 260nm 处的吸光度

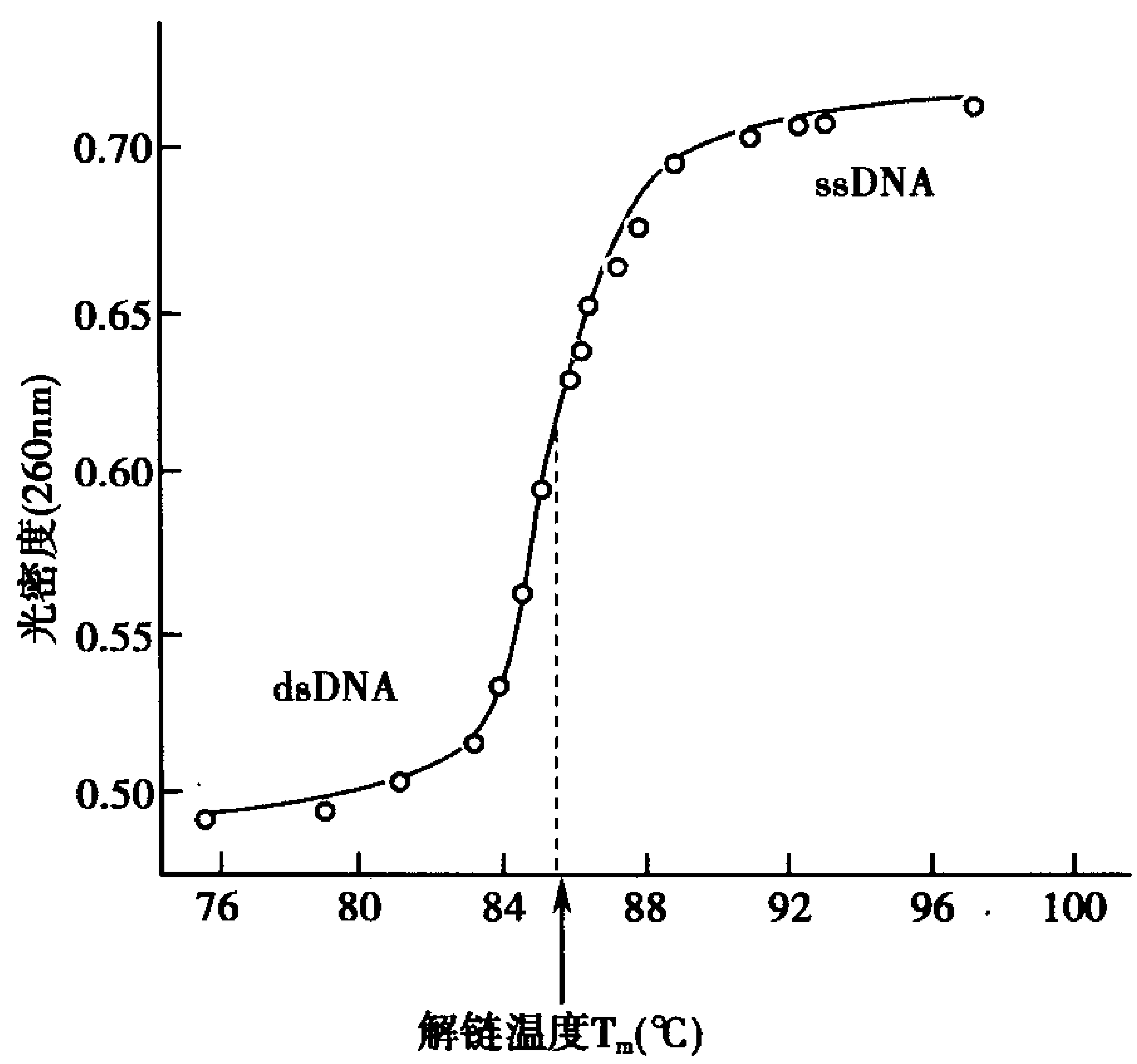


● 图 2-28　DNA 解链过程的示意图
在变性条件下，DNA 双链经历部分解链，大部分解链，直到全部解离为两条单链的过程

随之增加。这种现象称为 DNA 的增色效应（hyperchromic effect）。它是监测 DNA 双链是否发生变性的一个最常用的指标（图 2-29）。在实验室内最常用的 DNA 变性方法之一是加热。如果在连续加热 DNA 的过程中以温度相对于 A_{260} 值作图，所得的曲线称为解链曲线（melting curve）（图 2 30）。从曲线中可以看出，DNA 变性从开始解链到完全解链，是在一个相当窄的温度范围内完成的。在解链过程中，紫外吸光度的变化 ΔA_{260} 达到最大变化值的一半时所对应的温度称为 DNA 的解链温度，或称融解温度（melting temperature，T_m）。在此温度时，50%的 DNA 双链被打开。DNA 的 T_m 值与其 DNA 长短以及碱基的 GC 含量相关。GC 的含量越高，T_m 值越高；离子强度越高，T_m 值也越高。T_m 值可以根据 DNA 的长度及其 GC 含量来计算，简单的计算公式为：



● 图 2-29　DNA 在解链过程中表现出的增色效应
在 DNA 解链过程中，由于暴露的碱基不断增多使得 DNA 样品在 260nm 的紫外吸收不断增强



● 图 2-30　DNA 解链温度曲线
随着温度的上升，DNA 在 260nm 的紫外吸收不断增加，吸收达到饱和表明 DNA 双链全部解离成为单链。当 50%的 DNA 解离成为单链时的温度定义为解链温度（T_m）

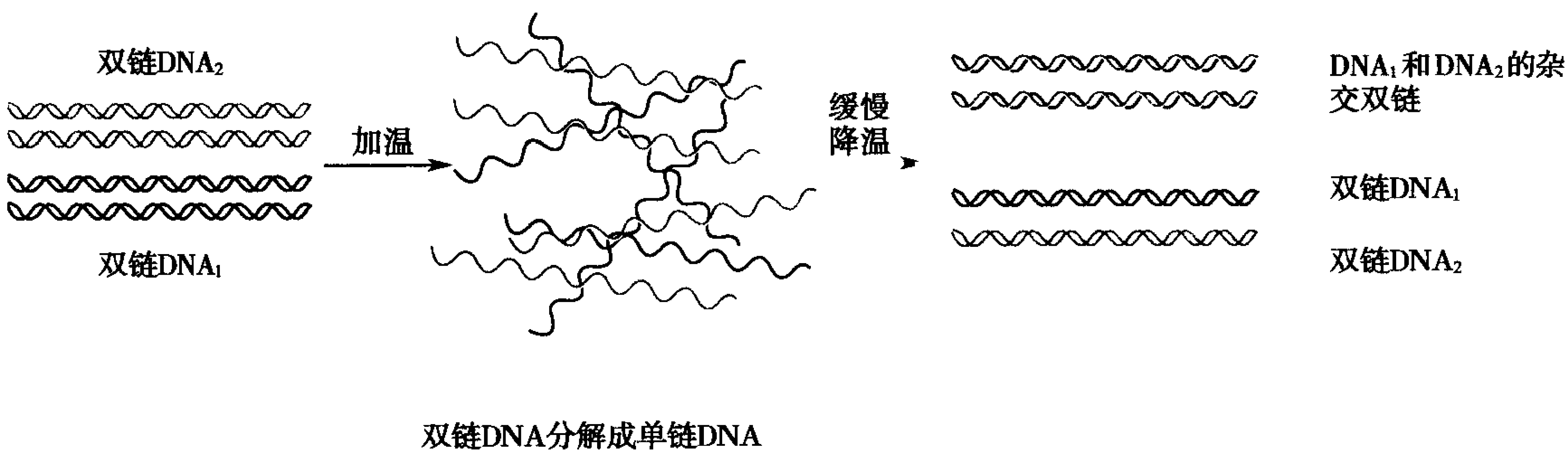
$$T_m = 69.3 + 0.41 \times \frac{(G+C)}{(G+C+A+T)} \times 100\%$$

小于 20bp 的寡核苷酸片段的 T_m 值可用公式 $T_m = 4(G+C)+2(A+T)$ 计算。

三、变性的核酸可以复性或形成杂交双链

当变性条件缓慢地除去后，两条解离的互补链可重新配对，恢复原来的双螺旋结构。这一现象称为复性（renaturation）。例如，热变性的 DNA 经缓慢冷却后可以复性，这一过程也称为退火（annealing）。但是，将热变性的 DNA 迅速冷却至 4℃以下，DNA 不可能发生复性。这一特性被用来保持 DNA 的变性状态。

在 DNA 的复性过程中，如果将不同种类的 DNA 单链或 RNA 放在同一溶液中，只要两种单链分子之间存在着一定程度的碱基配对关系，它们就有可能形成杂化双链（heteroduplex）。这种杂化双链可以在不同的 DNA 单链之间形成，可以在 RNA 单链之间形成，甚至还可以在 DNA 单链和 RNA 单链之间形成（图 2-31）。这种现象称为核酸分子杂交（hybridization）。这一原理可以用来研究 DNA 中某一种基因的位置、鉴定两种核酸分子间的序列相似性、检测某些专一序列在待检样品中存在与否等。Southern 印迹、Northern 印迹、斑点印迹以及近几年发展起来的基因芯片等核酸检测手段都是利用了核酸分子杂交的原理（详见第二十一章）。



●图 2-31　核酸分子复性和杂交的示意图

来自不同样品的双链 DNA_1 和双链 DNA_2 解离后，如果它们有同源序列，当温度缓慢降低时，单链的 DNA_1 可以和单链的 DNA_2 形成互补的杂化双链

第五节　核　酸　酶

核酸酶是所有可以水解核酸的酶。依据核酸酶底物的不同可以将其分为 DNA 酶（deoxyribonuclease，DNase）和 RNA 酶（ribonuclease，RNase）两类。DNA 酶能够专一性地催化脱氧核糖核酸的水解，而 RNA 酶能够专一性地催化核糖核酸的水解。按照对底物二级结构的专一性，核酸酶还有单链酶和双链酶之分。

依据对底物的作用方式可将核酸酶分为核酸外切酶（exonuclease）和核酸内切酶（endonuclease）。核酸外切酶仅能水解位于核酸分子链末端的磷酸二酯键。根据其作用的方向性，又有 5′→3′核酸外切酶和 3′→5′核酸外切酶之分。而核酸内切酶只可以在 DNA 或 RNA 分子内部切断磷酸二酯键。有些核酸内切酶要求酶切位点具有核酸序列特异性，称为限制性核酸内切酶（restriction endonuclease）。一般而言，酶切位点的核酸序列具有回文结构，识别长度为 4～8bp。有些核酸内切酶则没有序列特异性的要求。

细胞内的核酸酶一方面参与 DNA 的合成与修复及 RNA 合成后的剪接等重要的基因

复制和基因表达过程；另一方面负责清除多余的、结构和功能异常的核酸，同时也可以清除侵入细胞的外源性核酸，这些作用对于维持细胞的正常活动具有重要意义。核酸酶可以分泌到细胞外，例如在人体消化液中的核酸酶可以降解食物中的核酸以利吸收。特别是限制性核酸内切酶，由于它能够特异性地识别酶切位点，已经成为了分子生物学中的重要工具酶。目前已发现的约有 3 千种。

有些核酸酶属于多功能酶。例如，有些 DNA 聚合酶同时具有核酸外切酶活性，在 DNA 复制过程中可以切除错配的碱基，保证 DNA 生物合成的精确性（见第十章）。

小　　结

DNA 和 RNA 是多聚核苷酸的生物信息大分子。每一个核苷酸由碱基、戊糖和磷酸基团组成。碱基与戊糖通过糖苷键连接形成核苷。核苷与磷酸通过磷酯键连接形成核苷酸。DNA 由含有 A、G、C 和 T 的脱氧核糖核苷酸组成；而 RNA 由含有 A、G、C 和 U 的核糖核苷酸组成。

DNA 的一级结构是 DNA 核苷酸的排列顺序。DNA 对遗传信息的贮存正是利用碱基排列方式变化而实现的。DNA 的二级结构是反向平行、右手螺旋的互补双链。通过互补关系，DNA 双链中的腺嘌呤与胸腺嘧啶形成两个氢键的碱基对；鸟嘌呤与胞嘧啶形成三个氢键的碱基对。具有双螺旋结构的 DNA 在细胞内还将进一步折叠成为超螺旋结构，并且在蛋白质的参与下构成核小体、螺旋管、染色质纤维空管，最后组装成染色体。DNA 的生物功能是作为生物遗传信息复制的模板和基因转录的模板。

RNA 包括 mRNA、tRNA、rRNA 和 snmRNA。mRNA 在胞质中是蛋白质生物合成的模板。成熟的 mRNA 含有 5′末端帽结构和 3′-末端的多聚 A 尾结构。mRNA 的每 3 个核苷酸为一组构成了一个密码子，决定了肽链上的一个氨基酸。tRNA 在蛋白质合成过程中作为各种氨基酸的运载体。mRNA 和 tRNA 通过密码子-反密码子的碱基互补关系相互识别。rRNA 与核糖体蛋白构成核糖体，核糖体是蛋白质生物合成的场所。核糖体为 mRNA、tRNA 和肽链合成所需要的多种蛋白因子提供结合位点和相互作用所需要的空间环境。细胞内的 snmRNA 表现出了种类、结构和功能的多样性，是基因表达调控中必不可少的因子。

核酸具有多种重要理化性质，其中核酸的紫外吸收特性被广泛用来对核酸、核苷酸、核苷和碱基进行定性定量分析。

DNA 变性的本质是双链的解链。随着 DNA 的变性，双链从开始解链到完全解链，紫外光吸收值也随之增加。DNA 分子的 50%双链结构被打开时的温度称为 DNA 的解链温度（T_m）。在适当条件下，热变性的两条 DNA 互补单链可重新配对形成双链 DNA，这称为复性。在分子杂交过程中，只要核酸单链之间存在着碱基配对关系，就可以形成 DNA-DNA、RNA-RNA 以及 RNA-DNA 的杂化双链。互补杂交是核酸研究中一项非常重要的技术。

核酸酶是可以降解核酸的酶。核酸酶可以分为 DNA 酶和 RNA 酶两类；或分为核酸内切酶和核酸外切酶。具有序列特异性的限制性核酸内切酶是分子生物学的重要工具酶之一。

（关一夫　药立波）

第三章 酶

生物体内的千万种化学反应是维持生命活动的基本要素。这些化学反应有条不紊地进行有赖于高效、特异生物催化剂（biocatalyst）——酶的种类、活性与酶量的平衡。生物体内的酶（enzyme）是对其特异底物（substrate）起高效催化作用的蛋白质和核糖核酸，前者是机体内催化各种代谢反应最主要的催化剂。1982 年，Thomas Cech 从四膜虫 rRNA 前体的加工研究中首先发现 rRNA 前体本身具有自我催化作用，并提出核酶的概念。核酶（ribozyme）是具有催化作用的核糖核酸，为数不多，主要作用于核酸。

酶学与医学的关系密切。人体的许多疾病和酶的异常密切相关。许多酶已经用于临床诊断和治疗。许多药物也可通过对酶的影响来达到其治疗目的。酶工程已广泛地应用于生命科学、工业、农业等各个领域。随着酶学研究的深入，其成果必将为人类作出更大的贡献。

E. Buchner 的历史性贡献

随着对酵母细胞的深入研究，19 世纪欧洲掀起了研究生醇发酵机制的热潮。1850 年，L. Pasteur 经实验断定发酵是活酵母细胞的生理活动，离不开活的酵母细胞，并把能生醇的酵母称为酵素（ferment）。虽然 L. Pasteur 的“活力论”遭到了 Liebig 等著名科学家的反对，但由于 L. Pasteur 在科学界的巨大声望，他的活力论一直得到普遍的承认。直到 1897 年，德国化学家 E. Buchner成功地用无酵母细胞的酵母提取液实现了发酵，才彻底地结束了这场争论。E. Buchner 的发现是很偶然的。他制造酵母汁的最初目的是用于治疗某种疾病。为了保存新鲜的酵母汁，他按照当时厨房化学的方法，向酵母汁中加入蔗糖。他惊奇地发现，蔗糖很快转化为酒精。他于 1897 年发表了论文“没有酵母细胞的醇发酵”。这一发现打开了通向现代酶学和现代生物化学的大门。由于 E. Buchner 的历史性贡献，他于 1907 年获得了诺贝尔化学奖。

第一节 酶的分子结构与功能

19 世纪初，人们就已知道生物体内存在能催化化学反应的热不稳定物质。1926 年，美国生物化学家 J. B. Sumner 第一次从刀豆得到脲酶结晶，第一次证明了脲酶的蛋白质本质。以后的发现均证明酶的化学本质是蛋白质。酶和一般蛋白质一样，具有一、二、三级乃至四级结构。仅具有三级结构的酶称为单体酶（monomeric enzyme）；由多个相同或不同的亚基以非共价键连接组成的酶称为寡聚酶（oligomeric enzyme）。多酶体系（multienzyme system）是由几种不同功能的酶彼此聚合形成的多酶复合物。还有一些多酶体系在进化过程中由于基因的融合，多种不同催化功能存在于一条多肽链中，这类酶称为多功能酶（multifunctional enzyme）或串联酶（tandem enzyme）。

第一个证明酶是蛋白质的人

第一个证明酶是蛋白质的人是美国生物化学家 L. B. Sumner。L. B. Sumner17 岁时因玩枪不慎失去了左臂。他不顾家人反对，坚持学习化学。博士毕业后，他成为康内尔大学的助理教授。他以顽强的毅力和勇气，坚持他为自己确定的宏伟目标：纯化脲酶。尽管遭到权威教授的反对，他还是经过十余年的不懈努力，于 1926 年终于从南美热带植物刀豆中纯化出脲酶结晶。纯化液的酶活性比原液高 700 倍。脲酶结晶具有蛋白质的所有性质。3 年后，J. H. Northrop 证实了 L. B. Sumner 的发现，并结晶出许多酶。后来 W. M. Stanley 则利用他们的方法，将病毒结晶出来。由于当时检测技术的限制，无法确认他们得到的结晶的纯度。直到电泳和超离心发明以后，他们的成果才被承认。于是 20 年后，L. B. Sumner 与 J. H. Northrop、W. M. Stanley 才同获 1946 年的诺贝尔化学奖。

一、酶的分子组成中常含有辅助因子

酶按其分子组成可分为单纯酶（simple enzyme）和结合酶（conjugated enzyme）。单纯酶是仅由氨基酸残基构成的酶。脲酶、一些消化蛋白酶、淀粉酶、脂酶、核糖核酸酶等均属此列。结合酶由蛋白质部分和非蛋白质部分组成，前者称为酶蛋白（apoenzyme），后者称为辅助因子（cofactor）。辅助因子是金属离子或小分子有机化合物。酶蛋白与辅助因子结合形成的复合物称为全酶（holoenzyme），只有全酶才有催化作用。

金属离子是最常见的辅助因子，约 2/3 的酶含有金属离子。常见的金属离子有 K^+、Na^+、Mg^{2+}、Cu^{2+}（Cu^+）、Zn^{2+}、Fe^{2+}（Fe^{3+}）等。有的金属离子和酶结合紧密，提取过程中不易丢失，这类酶称为金属酶（metalloenzyme），如羧基肽酶、黄嘌呤氧化酶等。有的金属离子与酶的结合不甚紧密，这类酶称为金属激活酶（metal-activated enzyme），如己糖激酶、肌酸激酶等。金属辅助因子的作用是多方面的，主要是作为酶活性中心的催化基团参与催化反应、传递电子；作为连接酶和底物的桥梁，便于酶和底物密切接触；稳定酶的构象；中和阴离子，降低反应中的静电斥力等。

小分子有机化合物是一些化学稳定的小分子物质，称为辅酶（coenzyme）。其主要作用是参与酶的催化过程，在反应中传递电子、质子或一些基团。虽然与辅酶相结合的酶很多，但辅酶的种类却不多，且分子结构中常含有维生素或维生素类物质（表 3-1）。酶蛋白决定反应的特异性，辅酶决定反应的种类与性质。

表 3-1 某些辅酶（辅基）在催化中的作用

转移的基团	辅酶或辅基	
	名称	所含的维生素
氢原子（质子）	NAD^+（尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸，辅酶Ⅰ）	尼克酰胺（维生素 PP 之一）
	$NADP^+$（尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸，辅酶Ⅱ）	尼克酰胺（维生素 PP 之一）
	FMN（黄素单核苷酸）	
醛基	FAD（黄素腺嘌呤二核苷酸）	维生素 B_2（核黄素）
酰基	TPP（焦磷酸硫胺素）	维生素 B_2（核黄素）
烷基	辅酶 A（CoA）	维生素 B_1（硫胺素）
氨基	钴胺素辅酶类	泛酸
二氧化碳	磷酸吡哆醛，磷酸吡哆胺	维生素 B_{12}

续表

转移的基团	辅酶或辅基	
	名　称	所含的维生素
一碳单位	生物素 四氢叶酸	维生素 B_6（吡哆醛、吡哆胺） 生物素 叶酸

辅酶中与酶蛋白共价结合的辅酶又称为辅基（prosthetic group）。辅基和酶蛋白结合紧密，不能通过透析或超滤等方法将其除去，在反应中不能离开酶蛋白，如 FAD、FMN、生物素等。

辅酶Ⅰ的发现

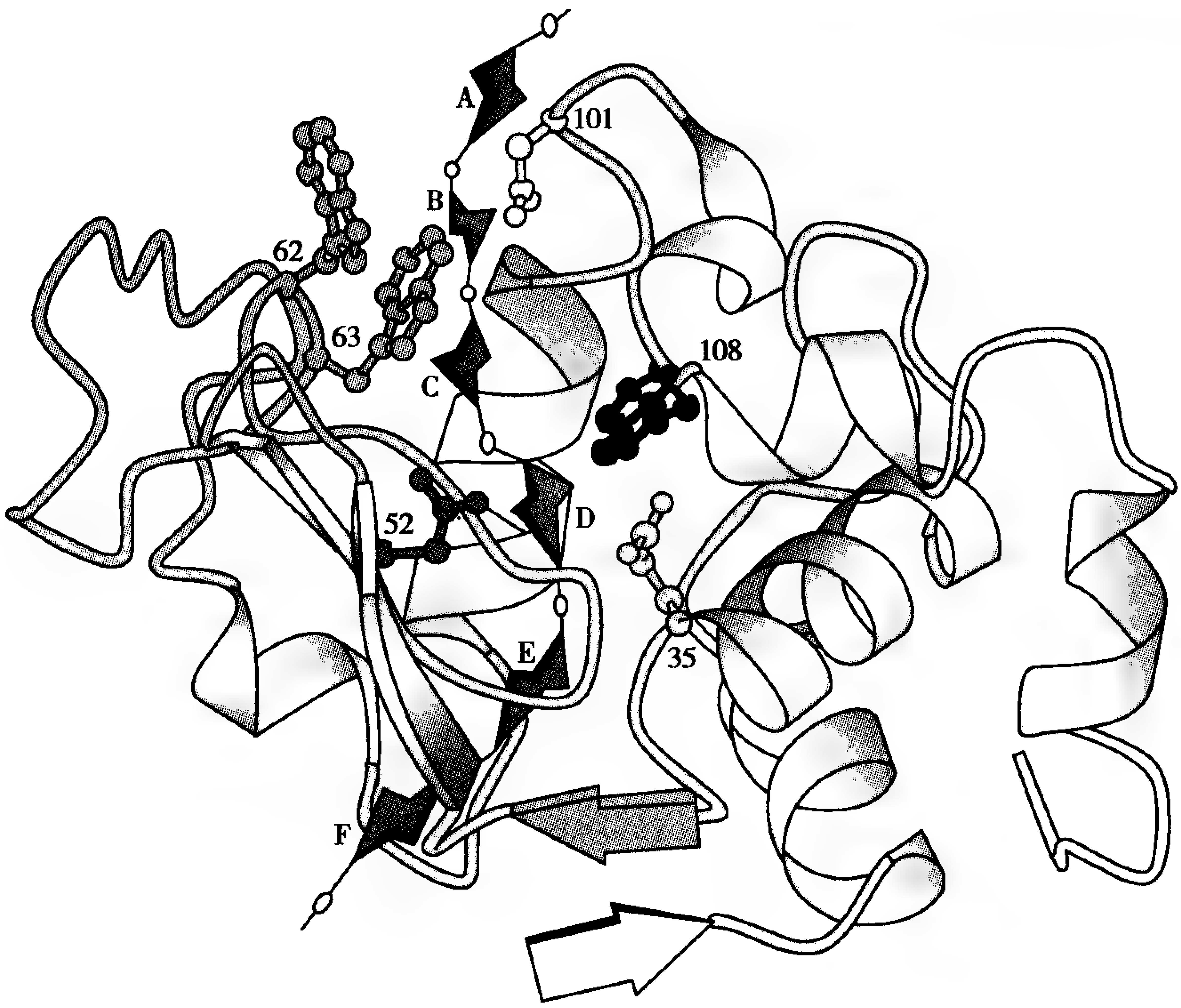
NAD^+ 的发现与发酵研究密不可分。英国化学家 A. Harden 将酵母汁透析得到酶蛋白和稳定的小分子两个组分。这两个组分单独没有催化活性，只有混合在一起才有催化作用。他称后一组分为辅酶。Hans von Euler-Chelpin 完成了对 NAD^+ 的化学属性的研究。他发现在发酵的很早阶段便有辅酶参与，并将此辅酶命名为辅酶Ⅰ（即 NAD^+）。Hans von Euler-Chelpin 发现，在肌肉、视网膜和大脑灰质等糖代谢活跃的组织、器官中辅酶Ⅰ的含量特别丰富。酵母是分离辅酶Ⅰ的最佳原料，但 1000g 酵母最多能分离出 0.02g 辅酶Ⅰ。他经过冗长的分离过程，从酵母中提取出辅酶Ⅰ，并把活性从原液中 200 单位提高到 85000 单位。经过分析，他发现辅酶Ⅰ组分中含有 1 个糖基、1 个腺嘌呤基和 1 个磷酸基，犹如核苷酸分子。1942 年，经过 Hans von Euler-Chelpin 等多人的努力，终于阐明了辅酶Ⅰ的分子结构。由于 A. Harden 和 Hans von Euler-Chelpin 在这一领域的杰出贡献，他们获得了 1929 年诺贝尔化学奖。

二、酶的活性中心是酶分子中执行其催化功能的部位

酶分子中氨基酸残基的侧链由不同的化学基团组成。其中一些与酶的活性密切相关的化学基团称作酶的必需基团（essential group）。这些必需基团在一级结构上可能相距很远，但在空间结构上彼此靠近，组成具有特定空间结构的区域，能和底物特异的结合并将底物转化为产物。这一区域称为酶的活性中心（active center）或活性部位（active site）。辅酶或辅基参与酶活性中心的组成。

酶活性中心内的必需基团有两类：结合基团（binding group）结合底物和辅酶，使之与酶形成复合物；催化基团（catalytic group）则影响底物中某些化学键的稳定性，催化底物发生化学反应并将其转变成产物。活性中心内的必需基团可同时具有这两方面的功能。组氨酸残基的咪唑基、丝氨酸残基的羟基、半胱氨酸残基的巯基以及谷氨酸残基的γ-羧基是构成酶活性中心的常见基团。还有一些必需基团虽然不参与活性中心的组成，但为维持酶活性中心应有的空间构象和（或）作为调节剂的结合部位所必需，这些基团是酶活性中心外的必需基团（图 3-1）。

酶的活性中心是酶分子中具有三维结构的区域，形如裂缝或凹陷。此裂缝或凹陷由酶的特定空间构象所维持，深入到酶分子内部，且多为氨基酸残基的疏水基团组成的疏水环境，形成疏水“口袋”。

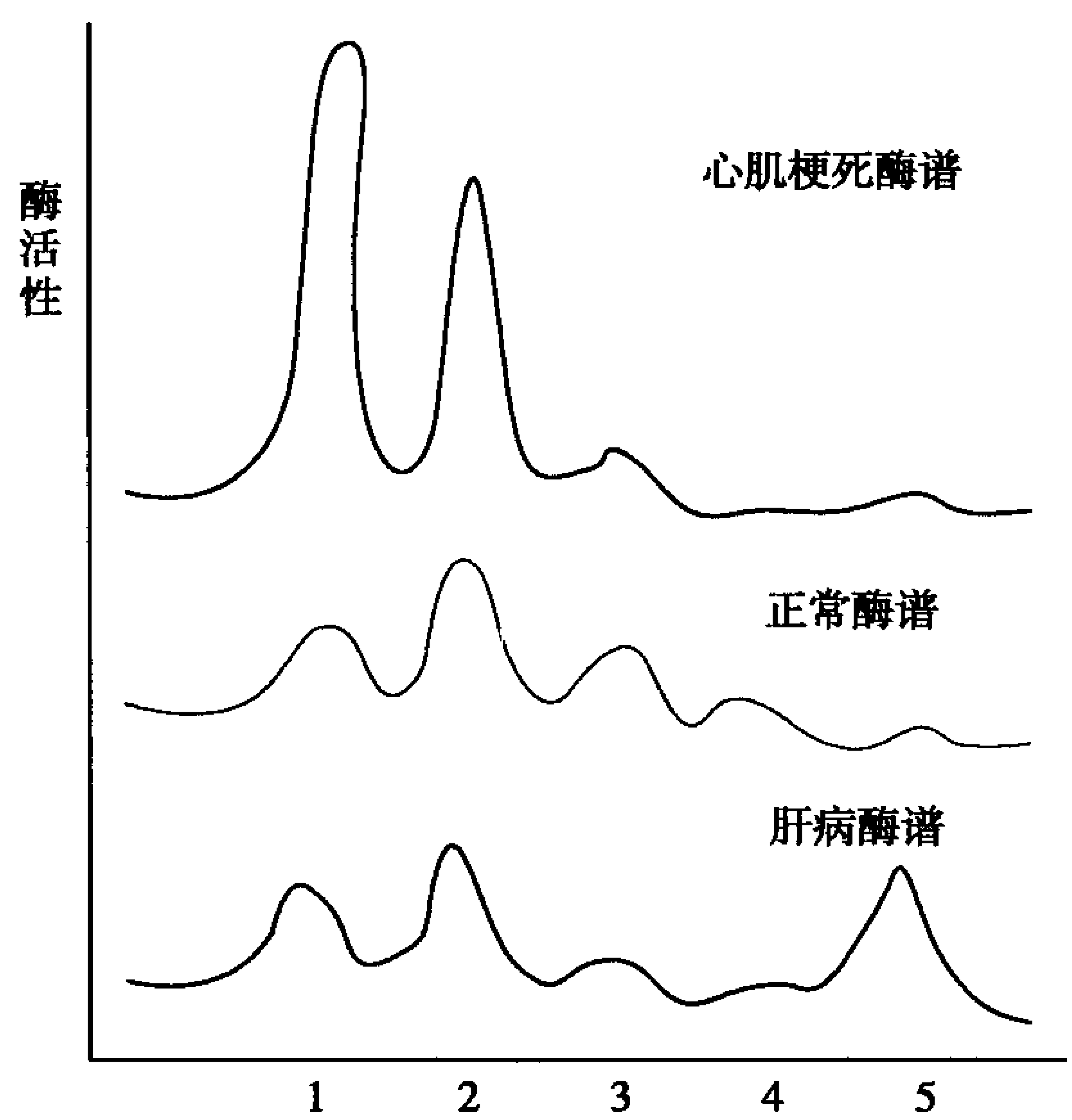


● 图 3-1 溶菌酶的活性中心

底物 $(NAG)_6$ 结合到溶菌酶活性中心的裂缝中；图中 A、B、C、D、E、F 代表底物 $(NAG)_6$ 和 6 个 N-乙酰氨基葡萄糖环，活性中心中的必需基团有 Glu35、Asp52、Asp 101 和 Trp108，其中前两个必需基团是催化基团，水解 D、E 之间的糖苷键

三、同工酶是催化相同化学反应但一级结构不同的一组酶

有些酶虽然其蛋白质一级结构存在差异，但其活性中心的三维结构相同或相似，可以催化相同的化学反应。同工酶（isoenzyme，isozyme）是指催化相同化学反应，但酶蛋白的分子结构、理化性质乃至免疫学性质不同的一组酶。根据国际生化学会的建议，同工酶是由不同基因编码的多肽链，或由同一基因转录生成的不同 mRNA 所翻译的不同多肽链组成的蛋白质。同工酶存在于同一种属或同一个体的不同组织或同一细胞的不同亚细胞结构中，它使不同的组织、器官和不同的亚细胞结构具有不同的代谢特征。这为同工酶用来诊断不同器官的疾病提供了理论依据。



● 图 3-2 心肌梗死与肝病患者血清同工酶谱的变化

正常血清 LDH_2 的活性高于 LDH_1，心肌梗死可见 LDH_1 大于 LDH_2，肝病时 LDH_5 活性升高

乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）是最先发现的同工酶。LDH 是四聚体酶。该酶的亚基有两型：骨骼肌型（M 型）和心肌型（H 型）。这两型亚基以不同的比例组成五种同工酶：LDH_1(H_4)、LDH_2(H_3M)、LDH_3(H_2M_2)、LDH_4(HM_3)和 LDH_5(M_4)。由于分子结构上的差异，这五种同工酶具有不同的电泳速率（这里 1 至 5 的次序代表在

碱性溶液中电泳速率递减的次序）。由于不同组织器官合成这两种亚基的速率不同和两种亚基之间杂交的情况不同，LDH 同工酶在不同组织器官中的种类、含量和分布比例不同（表 3-2）。这使不同的组织、细胞具有不同的代谢特点。

表 3-2 人体各组织器官中 LDH 同工酶的分布

组织器官	同工酶百分比				
	LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5
心肌	67	29	4	<1	<1
肾	52	28	16	4	<1
肝	2	4	11	27	56
骨骼肌	4	7	21	27	41
红细胞	42	36	15	5	2

肌酸激酶（creatine kinase，CK）是二聚体酶，其亚基有 M 型（肌型）和 B 型（脑型）两种。脑中含 CK_1（BB 型）；骨骼肌中含 CK_3（MM 型）；CK_2（MB 型）仅见于心肌。血清 CK_2 活性的测定有助于对心肌梗死的早期诊断。

同工酶的测定已应用于临床诊断。当某组织发生疾病时，可能有某种特殊的同工酶释放出来，同工酶谱的改变有助于对疾病的诊断（图 3-2）。

同工酶除了对临床诊断某些疾病有重要的参考价值外，还可以作为遗传标志，用于遗传分析研究。例如，人肝和肌肉的丙酮酸激酶同工酶之间无免疫交叉反应，但这两种同工酶的抗血清却都能与大肠杆菌丙酮酸激酶起反应。这说明在 15 亿年前，丙酮酸激酶还不存在同工酶。

第二节 酶的工作原理

酶与一般催化剂一样，在化学反应前后都没有质和量的改变。它们都只能催化热力学允许的化学反应；只能加速可逆反应的进程，而不改变反应的平衡点，即不改变反应的平衡常数。酶是蛋白质，又具有一般催化剂所没有的生物大分子特性，因此酶促反应具有其特殊的性质与反应机制。

一、酶反应特点

（一）酶反应具有极高的效率

酶的催化效率通常比非催化反应高 $10^8 \sim 10^{20}$ 倍，比一般催化剂高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍。例如，脲酶催化尿素的水解速率是 H^+ 催化作用的 7×10^{12} 倍；α-胰凝乳蛋白酶对苯酰胺的水解速率是 H^+ 的 6×10^6 倍，而且不需要较高的反应温度。许多可能需要数千年甚至于数百万年才能达到平衡的化学反应，在酶的催化下可能仅需要数秒或数分钟时间。酶的催化效率可用酶的转换数（turnover number）来表示。酶的转换数是指在酶被底物饱和的条件下，每个酶分子每秒钟将底物转化为产物的分子数。表 3-3 列出一些酶的转换数。

（二）酶促反应具有高度的特异性

与一般催化剂不同，酶对其所催化的底物具有较严格的选择性。即一种酶仅作用于一种或一类化合物，或一定的化学键，催化一定的化学反应并产生一定的产物，酶的这种特性称为酶的特异性或专一性（specificity）。根据酶对其底物分子结构选择的严格程度不同，酶的特异性可大致分为以下 3 种类型。

表 3-3 一些酶的转换数

酶	转换数[sec^{-1}]*
碳酸酐酶（carbonic anhydrase）	600，000
过氧化氢酶（catalase）	80，000
乙酰胆碱酯酶（acetylcholinesterase）	25，000
磷酸丙糖异构酶（triose phosphate isomerase）	4，400
α 淀粉酶（α-amylase）	300
肌肉乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase）	200
胰凝乳蛋白酶（chymotrypsin）	100
醛缩酶（aldolase）	11
溶菌酶（lysozyme）	0.5
果糖 2，6-二磷酸酶（fructose 2，6-bisphosphatase）	0.1

* 转换数是在酶被底物饱和的条件下测定的，受反应温度和 pH 等影响

1. 绝对特异性　有的酶只能作用于特定结构的底物分子，进行一种专一的反应，生成一种特定结构的产物。这种特异性称为绝对特异性（absolute specificity）。例如，脲酶仅能催化尿素水解生成 CO_2 和 NH_3；琥珀酸脱氢酶仅催化琥珀酸与延胡索酸之间的氧化还原反应。药物抑制这类酶时仅抑制一个反应。

2. 相对特异性　有一些酶的特异性相对较差，这种酶作用于一类化合物或一种化学键，这种不太严格的选择性称为相对特异性（relative specificity）。例如，磷酸酶对一般的磷酸酯键都有水解作用，可水解甘油或酚与磷酸形成的酯键；脂肪酶不仅水解脂肪，也水解简单的酯；蔗糖酶不仅水解蔗糖，也水解棉子糖中的同一种糖苷键。虽然不同的消化蛋白酶对肽键两旁氨基酸残基组成的要求有所不同（例如，胰蛋白酶仅水解由碱性氨基酸的羧基形成的肽键；氨基肽酶和羧基肽酶仅分别作用于多肽链的氨基末端与羧基末端），但对其催化的蛋白质种类却无严格要求。人体内的多种蛋白激酶（protein kinase）都催化其底物蛋白质丝氨酸（或苏氨酸）残基上羟基的磷酸化，虽然对其两侧共有序列（consensus sequence）的要求相似，却又各不相同（表 3-4）。

表 3-4 几种蛋白激酶的共有序列

蛋白激酶	共有序列*
蛋白激酶 A	-X-R-（R/K） X-（S/T）-B-
蛋白激酶 B	-X-R-X-（S/T）-X-K-
蛋白激酶 C	-（R/K）-（R/K）-X-（S/T）-B-（R/K）-（R/K）
蛋白激酶 G	-X-R-（R/K）-X-（S/T）-X-
Ca^{2+}/钙调蛋白激酶 I	-B-X-R-X-X-（S/T）-X-X X B-
Ca^{2+}/钙调蛋白激酶 II	-B-X-（R/K）-X-X-（S/T）-X-X-

* S=Ser；T=Thr；R=Arg；K=Lys；B=任何疏水氨基酸；X=任何氨基酸

3. 有些酶具有立体异构特异性（stereospecificity），仅作用于底物分子的一种立体异构体。例如，糖代谢的酶类仅作用于 *D*-葡萄糖及其衍生物，对 *L*-葡萄糖及其衍生物则无作用；蛋白质代谢的酶类仅作用于 *L*-氨基酸，对 *D*-氨基酸则无作用。除上述光学异构体外，有些酶对几何异构体也显示出立体异构特异性。例如，延胡索酸酶仅催化反丁烯二酸（延胡索酸）与苹果酸之间的裂解反应，对顺丁烯二酸则无作用。

（三）酶促反应具有的可调节性

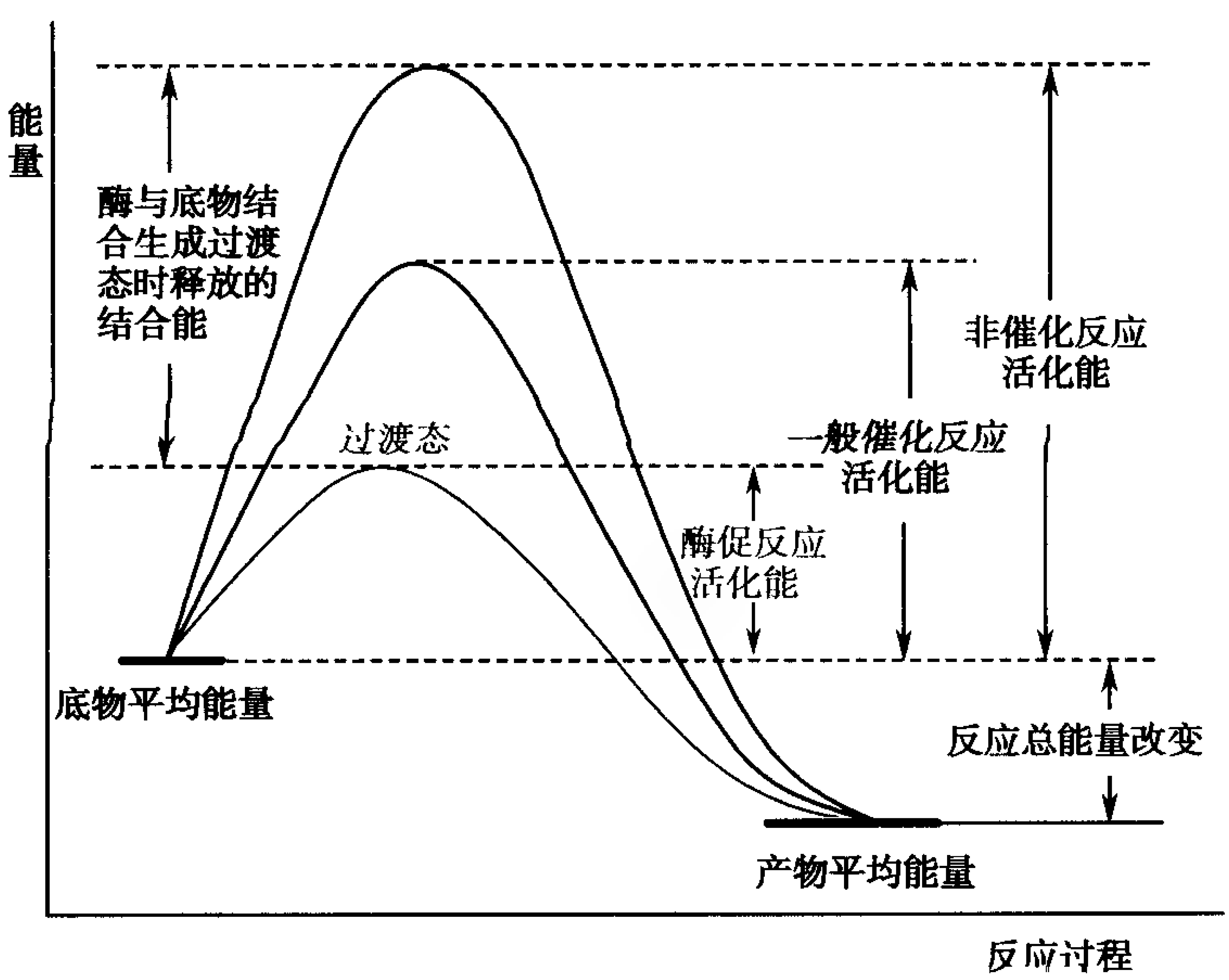
酶促反应受多种因素的调控，以适应机体对不断变化的内外环境和生命活动的需要。

例如，酶与代谢物在细胞内的区域化分布和进化过程中基因分化形成的各种同工酶使各组织器官、各亚细胞结构具有各自的代谢特点。酶原的激活使酶在合适的环境被激活和发挥作用。代谢物通过对代谢途径中关键酶、变构酶的抑制与激活和对酶的共价修饰，对酶活性进行快速调节。酶生物合成的诱导与阻遏、酶降解速率的调节可发挥对酶活性的长期调节作用。

二、酶通过促进底物形成过渡态而提高反应速率

（一）酶比一般催化剂更有效地降低反应活化能

酶和一般催化剂一样，加速反应的作用都是通过降低反应的活化能（activation energy）实现的。在任何一种热力学允许的反应体系中，底物分子所含能量的平均水平较低，底物之间很难发生化学反应。在反应的任何一瞬间，只有那些能量较高，达到或超过一定水平的过渡态（transition state）分子（即活化分子）才有可能发生化学反应。过渡态分子的结构介于底物和产物之间，不稳定，容易转变成产物或返回为底物。过渡态分子所具有的高出底物平均水平的能量称为活化能。活化能也就是底物分子从初态转变到过渡态所需的能量。酶通过与底物特异地结合，使底物形成活泼的过渡态，进而转化为产物。由于酶与底物的特异结合是释能反应，释放的结合能是降低活化能的主要能量来源，比一般催化剂更有效地降低反应的活化能，使底物只需较少的能量便可进入过渡态（图 3-3）。据计算，在 25℃时活化能每减少 4.184kJ/mol（1kcal/mol），反应速率可增高 5.4 倍。



●图 3-3 酶促反应活化能的改变
酶与底物结合生成过渡态的过程是释能反应，所释放的结合能降低反应的活化能

（二）酶和底物的结合有利于底物形成过渡态

酶活性部位的结合基团能否有效地和底物结合，将底物转化为过渡态，并释放结合能，从而降低活化能，是酶能否发挥其催化作用的关键。酶可通过多种机制达到此目的。

1. 诱导契合作用使酶与底物密切结合 酶在发挥其催化作用之前，必须先和底物密切结合。这种结合不是锁与钥匙式的机械关系，而是在酶和底物相互接近时，其结构相互诱导、相互变形和相互适应，进而相互结合。这一过程称为酶-底物结合的诱导契合（in-

duced fit)。酶的构象改变有利于与底物结合；底物在酶的诱导下也发生变形，处于不稳定的过渡态，易受酶的催化攻击。过渡态分子和酶活性中心的结构互相吻合。

2. 邻近效应与定向排列使诸底物正确定位于酶的活性中心 在两个以上底物参加的反应中，底物之间必须以正确的方向相互碰撞，才有可能发生反应。酶在反应中将诸底物结合到酶的活性中心，使它们相互接近并形成有利于反应的正确定向关系。这种邻近效应(proximity effect) 与定向排列 (orientation arrange) 实际上是将分子间的反应变成类似于分子内的反应，从而提高反应速率。

3. 表面效应使底物分子去溶剂化 酶的活性中心多是酶分子内部的疏水“口袋”，酶反应在此疏水环境中进行，使底物分子脱溶剂化（desolvation)，排除周围大量水分子对酶和底物分子中功能基团的干扰性吸引和排斥，防止水化膜的形成，利于底物与酶分子的密切接触和结合。这种现象称为表面效应（surface effect)。

（三）酶的催化机制呈多元催化作用

1. 酶是两性解离的蛋白质，酶活性中心有些基团可以作为质子的供体（酸)，有些基团则可以成为质子的接受体（碱)。这些基团参与质子的转移，可使反应速率提高 10^2～10^5 倍。这种催化作用称为一般酸-碱催化作用（general acid base catalysis)，是生物化学常见的催化机制。

2. 很多酶的催化基团在催化过程中通过和底物形成瞬间共价键而将底物激活，并很容易进一步被水解形成产物和游离的酶。这种催化机制称为共价催化作用（covalent catalysis)。

3. 酶活性中心有的基团属于亲核基团，可以提供电子给带有部分正电荷的过渡态中间物，从而加速产物的生成。这种催化作用称为亲核催化作用（nucleophilic catalysis)。

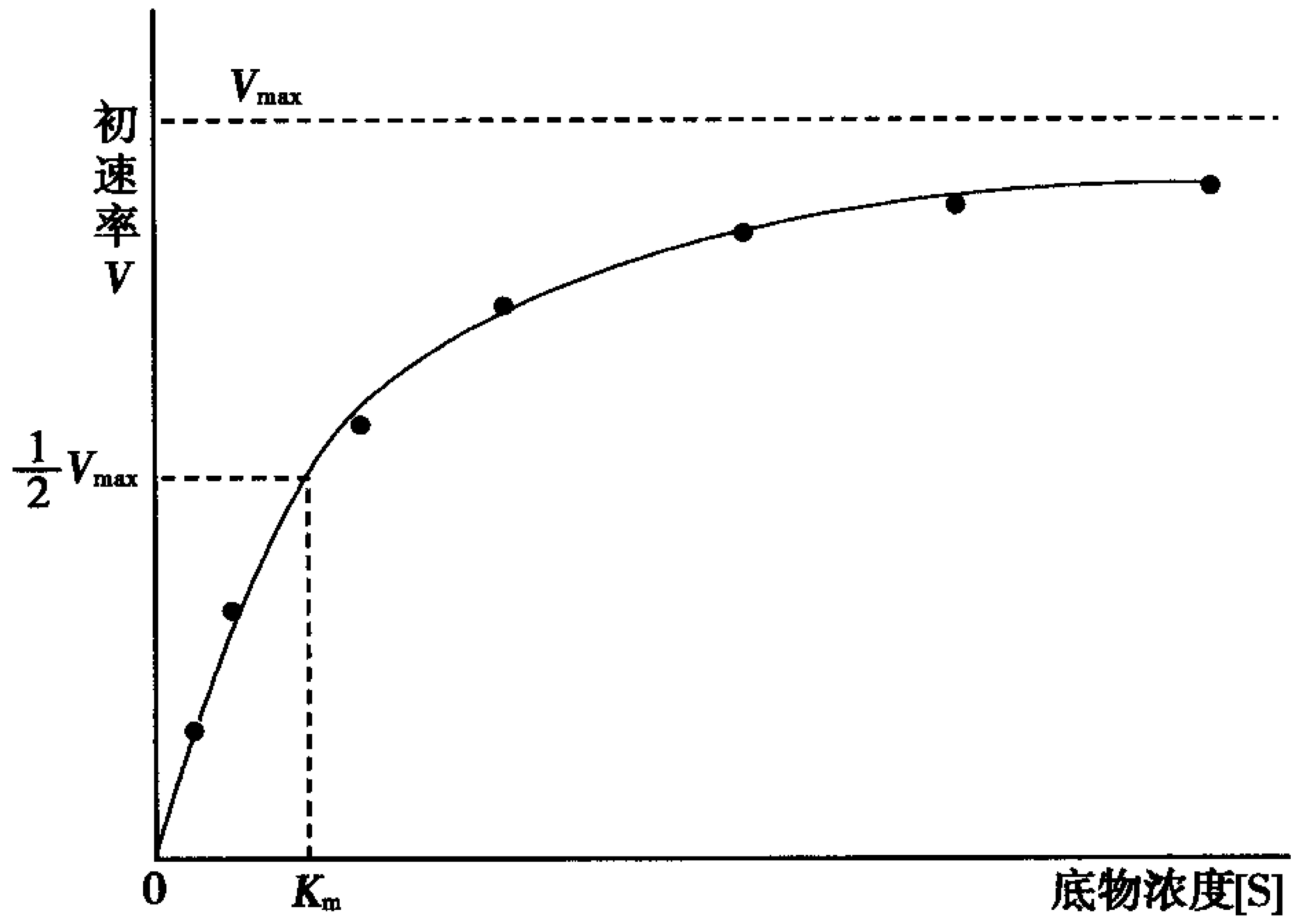
许多酶促反应常常有多种催化机制同时介入，共同完成催化反应，这是酶促反应高效率的重要原因。

第三节 酶促反应动力学

酶促反应动力学（kinetics of enzyme-catalyzed reaction）研究酶促反应速率及其影响因素。这些因素包括酶浓度、底物浓度、pH、温度、抑制剂、激活剂等。酶促反应动力学的研究具有重要的理论和实践意义。

一、底物浓度对反应速率影响的作图呈矩形双曲线

在其他因素不变的情况下，底物浓度的变化对反应速率影响的作图呈矩形双曲线（rectangular hyperbola) (图 3-4)。在底物浓度较低时，反应速率随底物浓度的增加而急剧上升，两者呈正比关系，反应呈一级反应。随着底物浓度的进一步增高，反应速率不再呈正比例加速。反应速率增加的幅度不断下降。如果继续加大底物浓度，反应速率将不再增加，表现出零级反应。此时酶的活性中心已被底物饱和。所有的酶均有此饱和现象，只是达到饱和时所需的底物浓度不同而已。



●图 3-4 底物浓度对酶促反应速率的影响

K_m 值等于酶促反应速率为最大速率一半时的底物浓度

(一) 米-曼氏方程式揭示单底物反应的动力学特性

解释酶促反应中底物浓度和反应速率关系的最合理学说是中间产物学说。酶首先与底物结合形成酶-底物复合物（中间产物），此复合物再分解为产物和游离的酶。

$$\underset{\text{酶}}{E} + \underset{\text{底物}}{S} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{中间产物}}{ES} \xrightarrow{k_3} \underset{\text{酶}}{E} + \underset{\text{产物}}{P} \tag{1}$$

1913 年 Leonor Michaelis 和 Maud L. Menten 提出了酶促反应速率和底物浓度关系的数学方程式。即著名的米-曼氏方程式，简称米氏方程式（Michaelis equation）：

$$V=\frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]} \tag{2}$$

式中 V_{max} 为最大反应速率（maximum velocity），[S] 为底物浓度，K_m 为米氏常数（Michaelis constant），V 是在不同[S]时的反应速率。当底物浓度很低（$[S]\ll K_m$）时，$V=\frac{V_{max}}{K_m}[S]$，反应速率与底物浓度呈正比。当底物浓度很高（$[S]\gg K_m$）时，$V\cong V_{max}$，反应速率达最大速率，再增加底物浓度也不再影响反应速率。

米氏方程式的推导基于这样的假设：①反应是单底物反应；②测定的反应速率为初速率，即反应刚刚开始，产物的生成量极少，逆反应可不予考虑；③[S]超过[E]，[S]的变化在测定初速率的过程中可忽略不计。反应式（1）中 k_1、k_2 和 k_3 分别为各向反应的速率常数。反应中游离酶的浓度为总酶浓度（[E]）减去结合到中间产物中的酶的浓度（[ES]），即[游离酶]＝[E]－[ES]

这样，ES 生成的速率 $\frac{d[S]}{dt}=k_1([E]-[ES])[S]$ (3)

ES 分解的速率 $\frac{-d[S]}{dt}=k_2[ES]+k_3[ES]$ (4)

当反应处于稳态时，ES 的生成速率＝ES 的分解速率，即

$$k_1([E]-[ES])[S]=k_2[ES]+k_3[ES]$$

经整理，$\frac{([E]-[ES])[S]}{[ES]}=\frac{k_2+k_3}{k_1}$

令 $\frac{k_2+k_3}{k_1}=K_m$，K_m 即为米氏常数，

则 $[E][S]-[ES][S]=K_m[ES]$

$$[ES]=\frac{[E][S]}{K_m+[S]} \tag{5}$$

由于反应速率取决于单位时间内产物 P 的生成量，所以 $V=k_3[ES]$

将式（5）代入得：

$$V=\frac{k_3[E][S]}{K_m+[S]} \tag{6}$$

当底物浓度很高，所有的酶都和底物生成中间产物（即[E]＝[ES]）时，反应达最大速率。即 $V_{max}=k_3[ES]=k_3[E]$ (7)

将式（7）代入式（6），得米氏方程式：

$$V=\frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]}$$

(二) K_m 与 V_m 是有意义的酶促反应动力学参数

1. 当反应速率为最大速率一半时，米氏方程式可以变换如下：

$$\frac{V_{max}}{2}=\frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]}$$

进一步整理得 $K_m=[S]$。由此可见，K_m 值等于酶促反应速率为最大速率一半时的底物浓度。

2. 已知，$K_m=\frac{k_2+k_3}{k_1}$，当 $k_2 \gg k_3$ 时，即 ES 解离成 E 和 S 的速率大大超过分解成 E 和 P 的速率时，k_3 可以忽略不计。此时 K_m 值近似于 ES 的解离常数 K_s。在这种情况下，K_m 值可用来表示酶对底物的亲和力。

$$K_m=\frac{k_2}{k_1}=\frac{[E][S]}{[ES]}=K_s$$

此时，K_m 值愈小，酶对底物的亲和力愈大。这表示不需要很高的底物浓度便可容易地达到最大反应速率。但 k_3 值并非在所有酶促反应中都远小于 k_2，所以 K_s 值和 K_m 值涵义不同，不能互相代替使用。

3. K_m 值是酶的特性常数之一，只与酶的结构、底物和反应环境（如温度、pH、离子强度）有关，与酶的浓度无关。各种酶的 K_m 值范围很广，大致在 10^{-6}～10^{-2}mol/L 之间。对于同一底物，不同的酶有不同的 K_m 值；多底物反应的酶对其众底物的 K_m 值也各不相同。

4. V_{max}是酶完全被底物饱和时的反应速率，与酶浓度呈正比。如果酶的总浓度已知，便可从 V_{max}计算酶的转换数（turnover number），例如，10^{-6}mol/L 的碳酸酐酶溶液在一秒钟内催化生成 0.6mol/L H_2CO_3，则每秒钟每 1 分子酶可催化生成 6×10^5 个分子的 H_2CO_3。

$$k_3=\frac{V_{max}}{[E]}=\frac{0.6\text{mol/L/s}}{10^{-6}\text{mol/L}}=6\times10^5\text{s}^{-1}$$

动力学常数 k_3 称为酶的转换数。对于生理性底物来说，大多数酶的转换数在 $1\sim10^4/$秒之间。

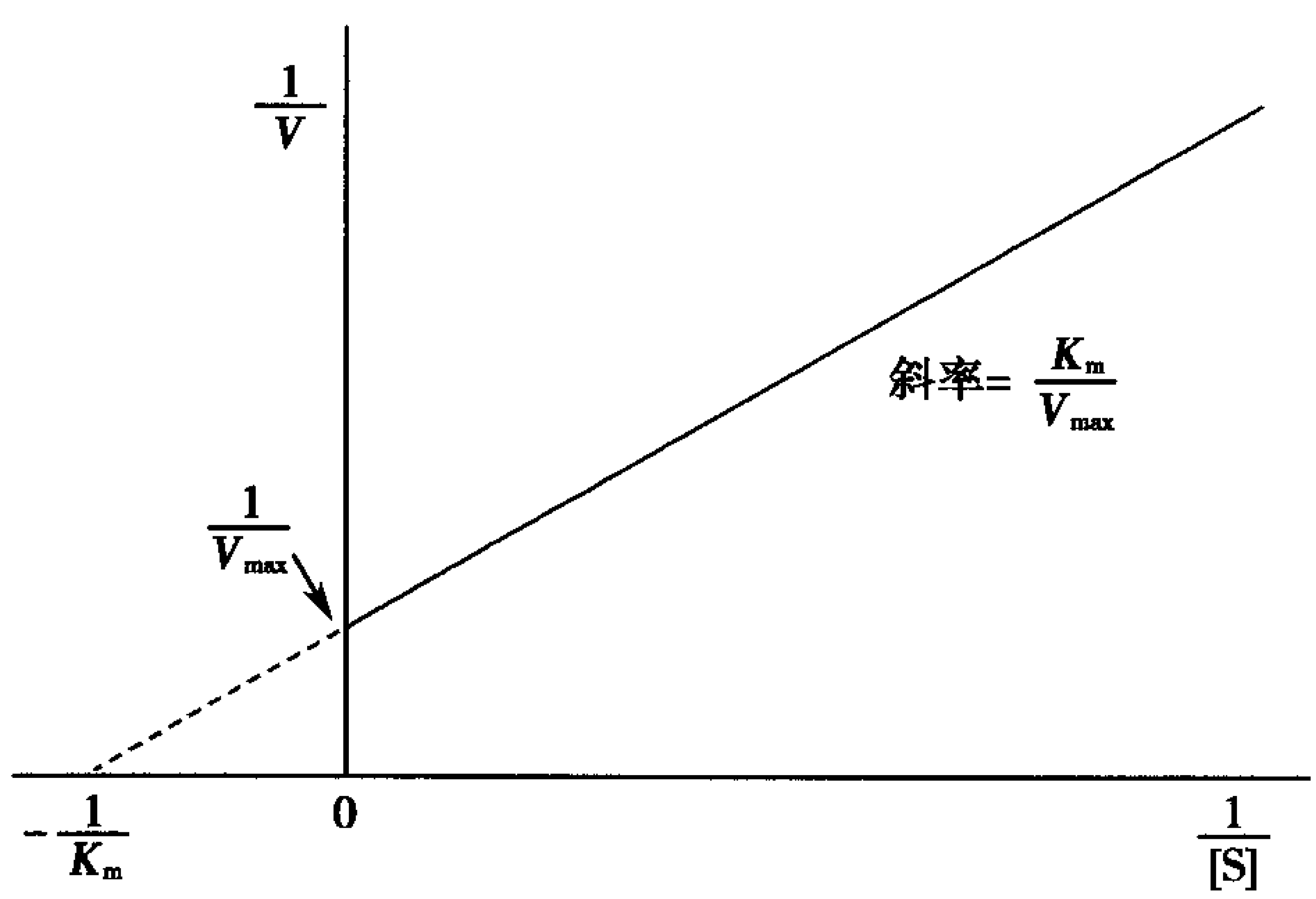
(三) K_m 值和 V_{max}值可以通过作图法求取

如图 3-4 所示，底物浓度曲线是矩形双曲线，其图形为渐进线，很难准确地测得 K_m 值和 V_{max}值。过高的底物浓度不仅不易测得 V_{max}值，在实验中还会出现很多困难。若将米氏方程式进行种种变换，将曲线作图改为直线作图，便可容易地用图解法准确求得 K_m 值和 V_{max}值。

双倒数作图法（double reciprocal plot）又称为林-贝氏（Lineweaver-Burk）作图法，是最常见的作图法。它将米氏方程式等号两边取倒数，所得到的双倒数方程式称作林-贝氏方程式：

$$\frac{1}{V}=\frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}} \qquad (8)$$

以 $1/[S]$对 $1/V$ 作图（图 3-5），得一直线，其纵轴上的截距为 $1/V_{max}$，横轴上的截距为



●图 3-5 双倒数作图法

$-1/K_m$。此作图法除用于求取 K_m 值和 V_{max} 值外，还可用于判断可逆性抑制反应的性质。

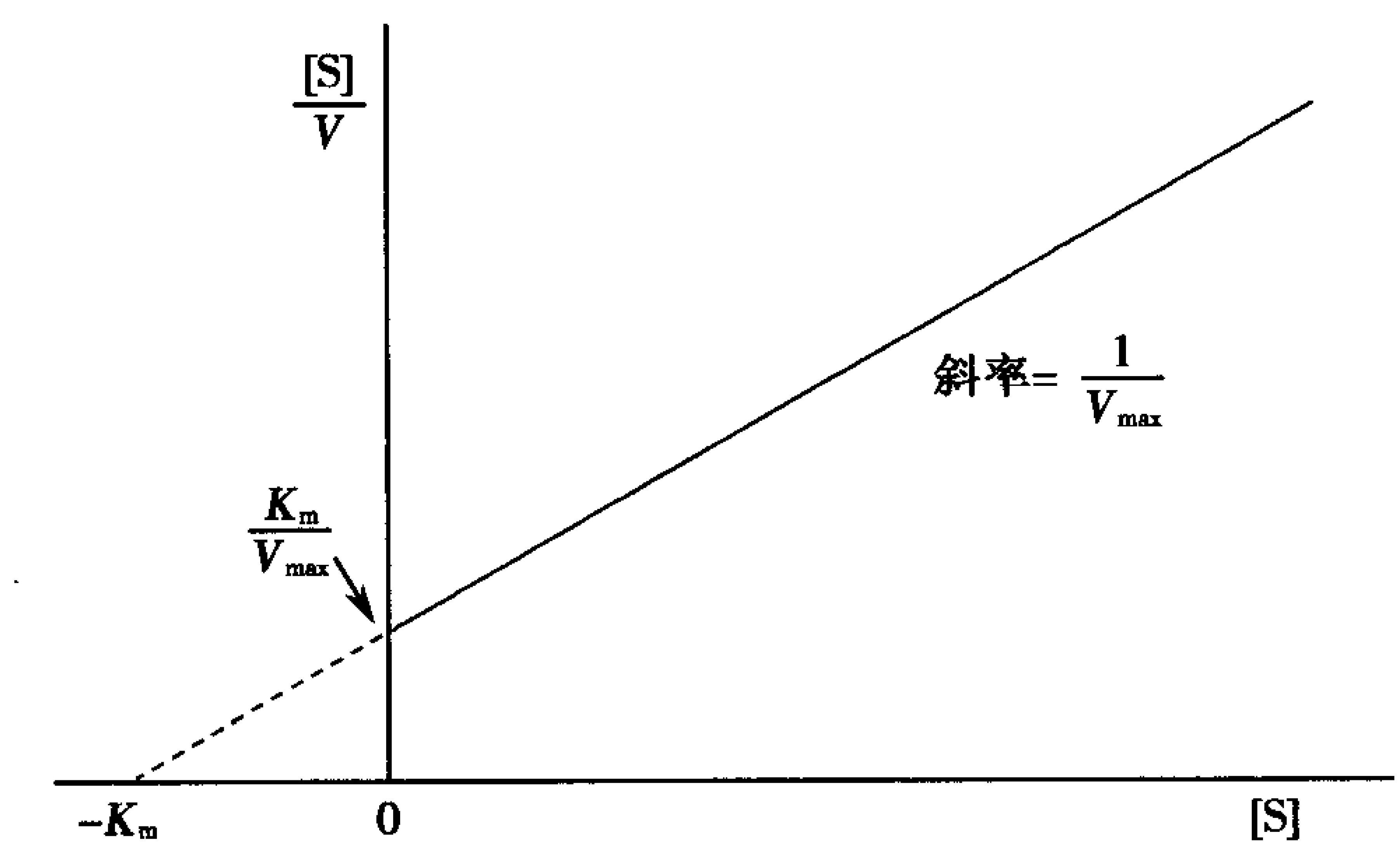
此外，Hanes 作图法（图 3-6）也是从米氏方程式衍化来的，其方程式为

$$\frac{[S]}{V}=\frac{K_m}{V_{max}}+\frac{1}{V_{max}}[S]$$

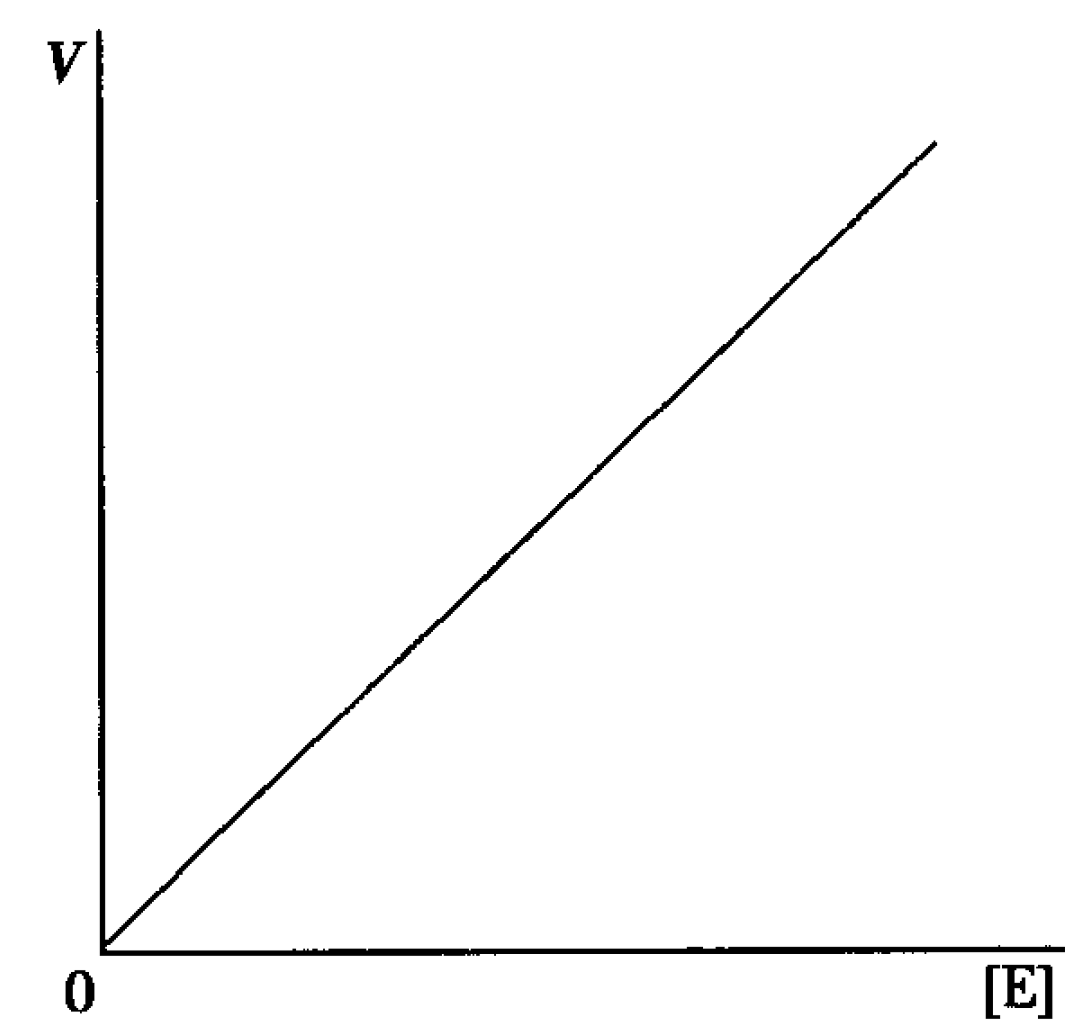
以[S]对[S]/V 作图（图 3-5），横轴截距为$-K_m$，直线的斜率为 $1/V_{max}$。

二、底物足够时酶浓度对反应速率的影响呈直线关系

在酶促反应系统中，当底物浓度大大超过酶的浓度，酶被底物饱和时，反应速率达最大速率。此时，反应速率和酶浓度变化呈正比关系（图 3-7）。从式（6）可知，当[S]≫[E]时，式中 K_m 可以忽略不计，其关系式可简化为 $V=k_3[E]$。

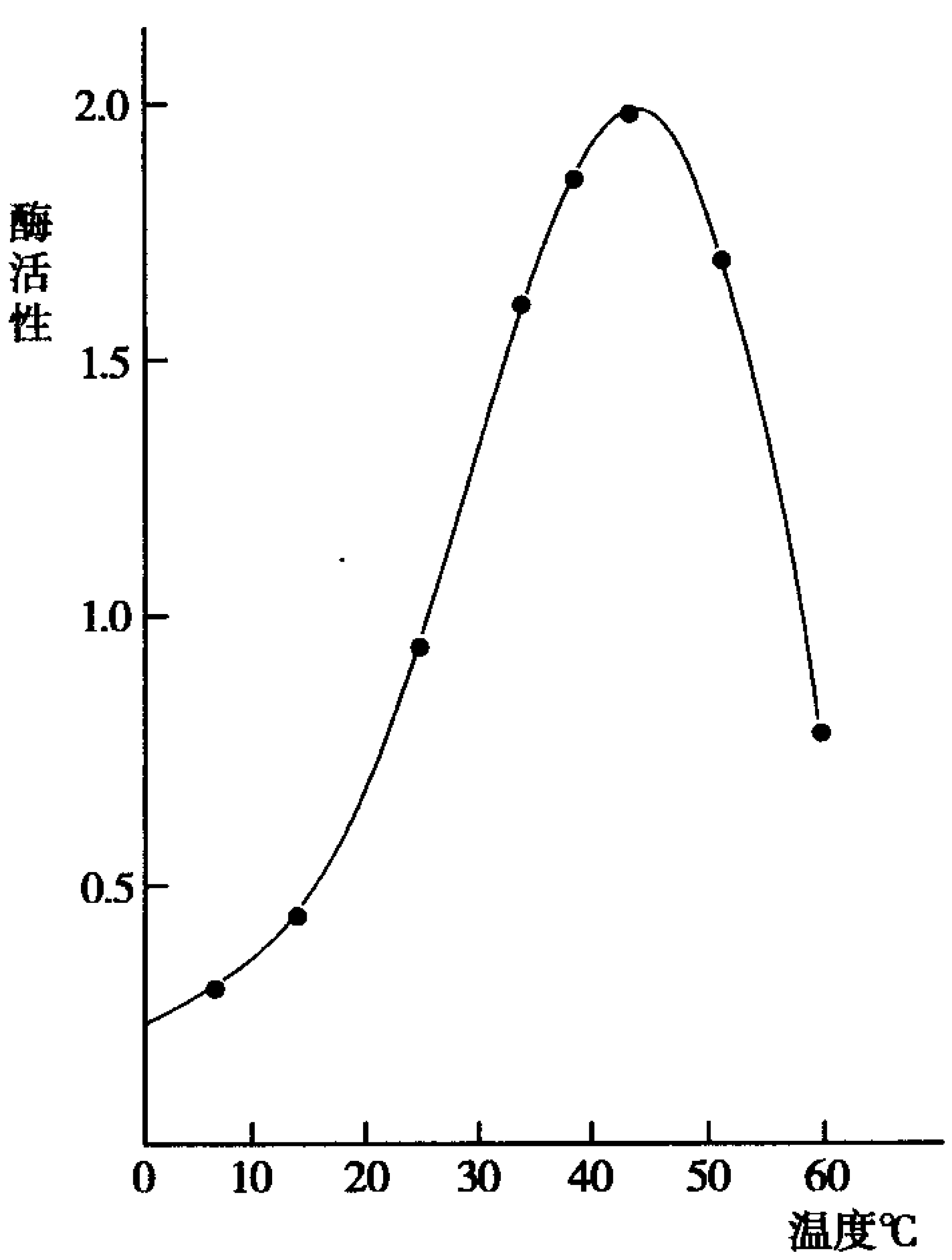


●图 3-6 Hanes 作图法



●图 3-7 酶浓度对反应速率的影响

三、温度对反应速率的影响具有双重性



●图 3-8 温度对淀粉酶活性的影响

酶是生物催化剂，温度对酶促反应速率具有双重影响。升高温度一方面可加快酶促反应速率，同时也增加酶变性的机会。温度升高到 60℃以上时，大多数酶开始变性；80℃时，多数酶的变性已不可逆转。综合这两种因素，酶促反应速率最快时反应体系的温度称为酶促反应的最适温度（optimum temperature）。温血动物组织中酶的最适温度多在 35～40℃之间。反应体系的温度低于最适温度时，温度加快反应速率这一效应起主导作用，温度每升高 10℃，反应速率可加大 1～2 倍。温度高于最适温度时，反应速率则因酶变性而降低（图 3-8）。

酶的最适温度不是酶的特征性常数，它与反应进行的时间有关。酶可以在短时间内耐受较高的温度。相反，延长反应时间，最适温度便降低。

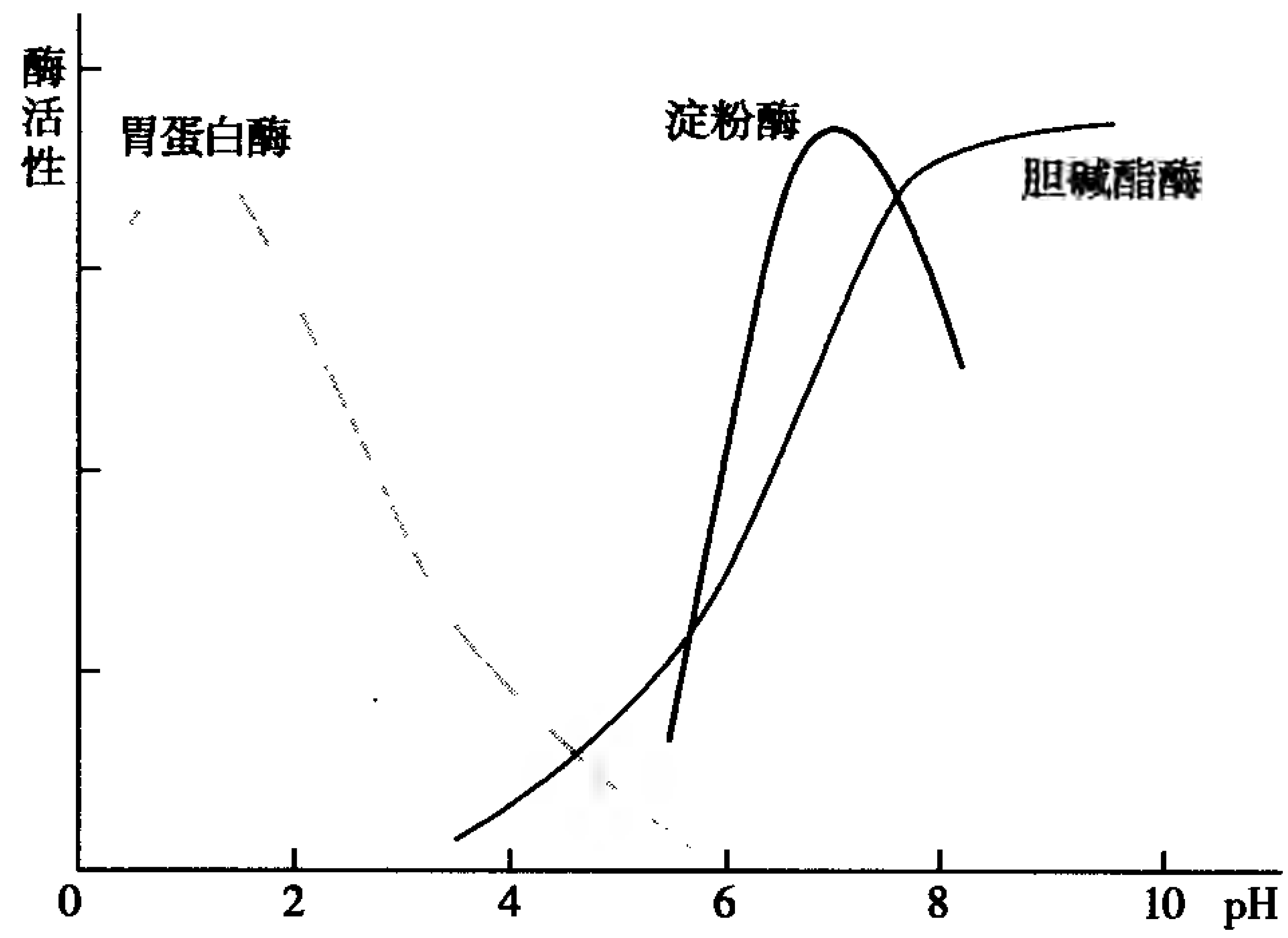
酶的活性虽然随温度的下降而降低，但低温一般不使酶破坏。温度回升后，酶又恢复其活性。临床上低温麻醉便是利用酶的这一性质以减慢组织细胞代谢速率，提高机

体对氧和营养物质缺乏的耐受性。低温保存菌种也是基于这一原理。生化实验中测定酶活性时，应严格控制反应液的温度。酶制剂应保存在冰箱中，从冰箱中取出后应立即应用，以免酶发生变性。

酶的最适温度相当于细胞最适生活环境的温度，或稍高。生活在温泉或深海中的细菌，酶的最适温度甚至可以达到水的沸点。聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）所需的热稳定 DNA 聚合酶便是从生活在 70～80℃的栖热水生菌（thermus aquaticus）中提取的，此酶可耐受近 100℃的高温。

四、pH 通过改变酶和底物分子解离状态影响反应速率

酶分子中的许多极性基团，在不同的 pH 条件下解离状态不同，其所带电荷的种类和数量也各不相同，酶活性中心的某些必需基团往往仅在某一解离状态时才最容易同底物结合或具有最大的催化活性。许多具有可解离基团的底物和辅酶（如 ATP、NAD^+、辅酶 A、氨基酸等）的荷电状态也受 pH 改变的影响，从而影响酶对它们的亲和力。此外，pH 还可影响酶活性中心的空间构象，从而影响酶的活性。因此，pH 的改变对酶的催化作用影响很大（图 3-9）。酶催化活性最高时反应体系的 pH 称为酶促反应的最适 pH（optimum pH）。虽然不同酶的最适 pH 各不相同，但除少数（如，胃蛋白酶的最适 pH 约为 1.8，肝精氨酸酶最适 pH 为 9.8）外，动物体内多数酶的最适 pH 接近中性。



●图 3-9 pH 对某些酶活性的影响

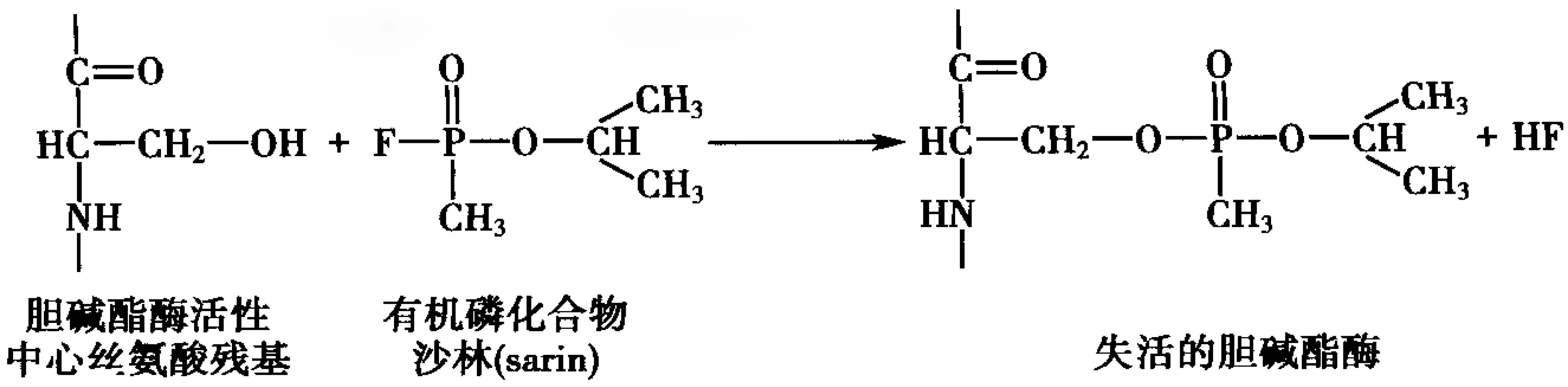
最适 pH 不是酶的特征性常数，它受底物浓度、缓冲液种类与浓度以及酶纯度等因素的影响。溶液 pH 高于或低于最适 pH 时，酶活性降低，远离最适 pH 时还会导致酶变性失活。在测定酶活性时，应选用适宜的缓冲液以保持酶活性的相对恒定。

五、抑制剂可逆地或不可逆地降低酶促反应速率

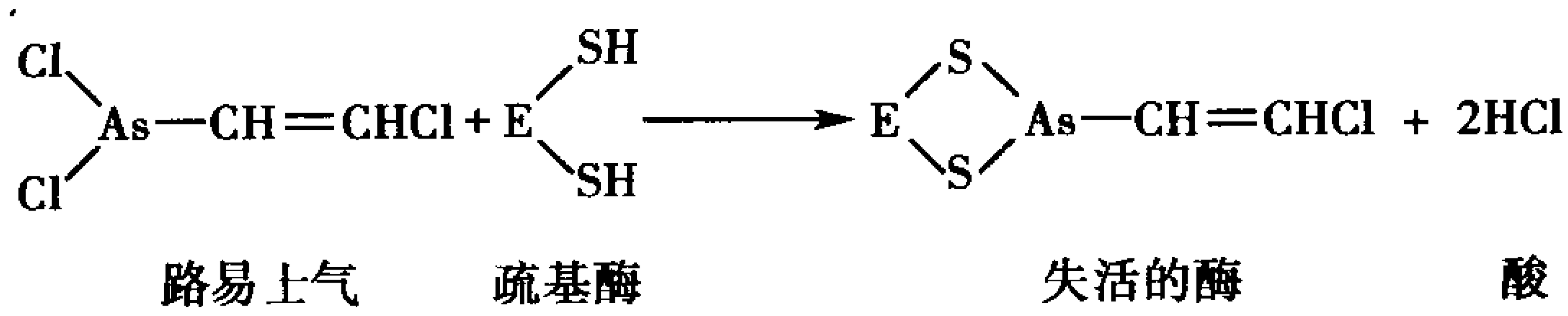
凡能使酶催化活性下降而不引起酶蛋白变性的物质统称酶的抑制剂（inhibitor）。抑制剂多与酶活性中心内、外必需基团相结合，从而抑制酶的催化活性。除去抑制剂后酶活性得以恢复。根据抑制剂和酶结合的紧密程度不同，酶的抑制作用分为不可逆性抑制与可逆性抑制两类。

（一）不可逆性抑制剂主要与酶共价结合

不可逆性抑制作用（irreversible inhibition）的抑制剂通常和酶活性中心上的必需基团以共价键相结合，使酶失活。此种抑制剂不能用透析、超滤等方法予以去除。农药敌百虫、敌敌畏等有机磷化合物能特异地与胆碱酯酶（choline esterase）活性中心丝氨酸残基的羟基结合，使酶失活。乙酰胆碱的积蓄会造成迷走神经的毒性兴奋状态。



低浓度的重金属离子（如 Hg^{2+}、Ag^{+} 等）及 As^{3+} 可和酶分子的巯基结合，使酶失活。由于这些抑制剂所结合的巯基不局限于必需基团，所以此类抑制剂又称为非专一性抑制剂。化学毒气路易士气（Lewisite）是一种含砷化合物，它能抑制体内巯基酶而使人畜中毒。

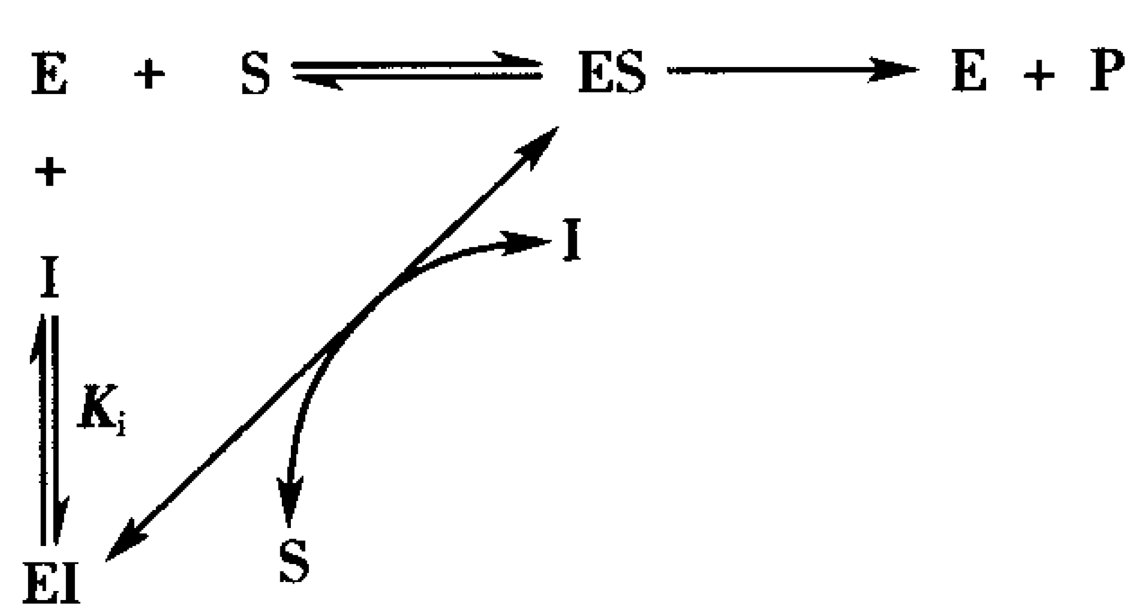


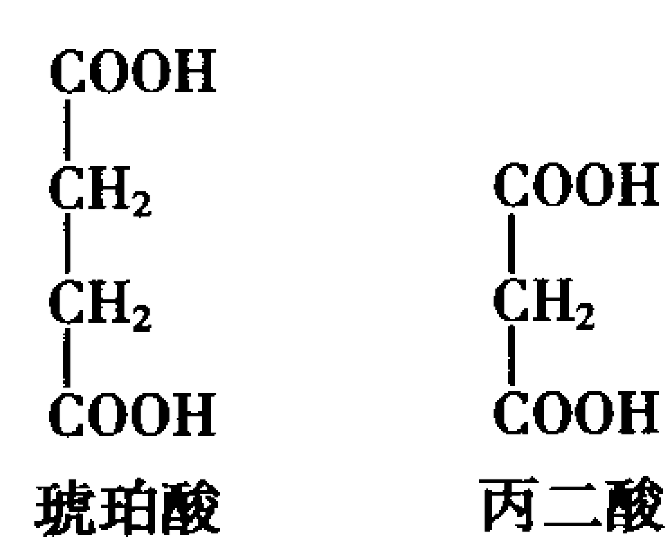
这些中毒可用药物防护和解毒。解磷定（pyridine aldoxime methyliodide，PAM）可解除有机磷化合物对羟基酶的抑制作用。重金属盐引起的巯基酶中毒可用富含巯基的二巯基丙醇（british anti-Lewisite，BAL）解毒。BAL 含有 2 个—SH，在体内达到一定浓度后，可与毒剂结合，使酶恢复活性。

（二）可逆性抑制剂与酶和（或）酶-底物复合物非共价结合

可逆性抑制作用（reversible inhibition）的抑制剂通过非共价键与酶和（或）酶-底物复合物可逆性结合，使酶活性降低或消失。采用透析或超滤等方法可将抑制剂除去。下面介绍 3 种常见的可逆性抑制作用。

1. 竞争性抑制作用的抑制剂与底物竞争结合酶的活性中心　有些抑制剂和酶的底物结构相似，可与底物竞争酶的活性中心，从而阻碍酶和底物结合成中间产物。这种抑制作用称为竞争性抑制作用（competitive inhibition）。由于抑制剂和酶的结合是可逆的，抑制程度取决于抑制剂与酶的相对亲和力和与底物浓度的相对比例。丙二酸对琥珀酸脱氢酶的抑制作用是竞争性抑制作用的典型实例。酶对丙二酸的亲和力远大于酶对琥珀酸的亲和力，当丙二酸浓度仅为琥珀酸浓度的 1/50 时，酶活性便被抑制 50%。若增大琥珀酸浓度，此抑制作用可被削弱。竞争性抑制作用的反应式如下。





酶和抑制剂结合形成的复合物 EI 不能转化为产物。其中，K_i 称为抑制常数，即酶-抑制剂复合物的解离常数。按米氏方程式的推导方法衍化出竞争性抑制剂、底物和反应速率之间的动力学关系如下：

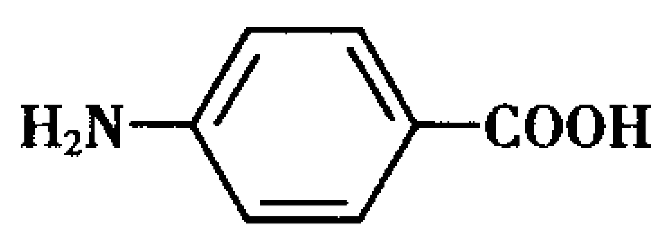
$$V=\frac{V_{max}[S]}{K_m\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)+[S]}$$

其双倒数方程式为：

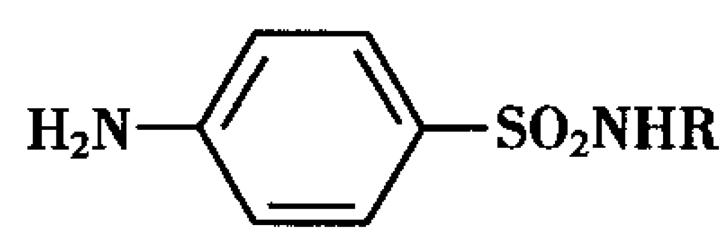
$$\frac{1}{V}=\frac{K_m}{V_{max}}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}}$$

有不同浓度抑制剂存在时，以 1/[S]对 1/V 作图（图 3-10）可见，无论竞争性抑制剂的浓度如何，各直线在纵轴上的截距均为 1/V_{max}，与无抑制剂时相同。这说明酶促反应 V_{max}不因有竞争性抑制剂的存在而改变。有竞争性抑制剂存在时，从横轴截距量得的“K_m 值”（称为表观 K_m 值，apparent K_m）大于无抑制剂存在时的 K_m 值，可见，竞争性抑制作用使酶的表观 K_m 值增大。

竞争性抑制作用的原理可用来阐明某些药物的作用机制和指导探索合成控制代谢的新药物。磺胺类药物是典型的代表。对磺胺类药物敏感的细菌在生长繁殖时，不能直接利用环境中的叶酸，而是在菌体内二氢叶酸合成酶（dihydrofolic acid synthetase）催化下，以对氨基苯甲酸为底物合成二氢叶酸。二氢叶酸是核苷酸合成过程中的辅酶之一四氢叶酸的前体。磺胺类药物的化学结构与对氨基苯甲酸相似，是二氢叶酸合成酶的竞争性抑制剂，抑制二氢叶酸合成。细菌则因此造成核苷酸与核酸合成受阻而影响其生长繁殖。人类能直接利用食物中的叶酸，核酸合成不受磺胺类药物的干扰。根据竞争性抑制的特点，服用磺胺类药物时必须保持血液中药物的高浓度，以发挥其有效的竞争性抑菌作用。



对氨基苯甲酸

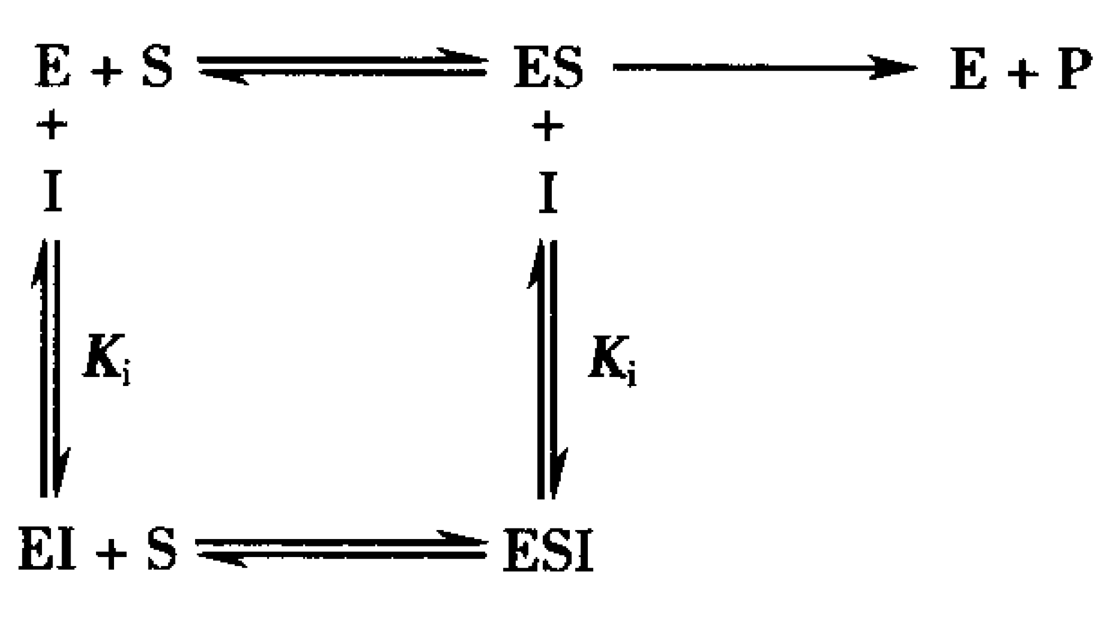


磺胺类药物

许多属于抗代谢物的抗癌药物，如甲氨蝶呤（MTX）、5-氟尿嘧啶（5-FU）、6-巯基嘌呤（6-MP）等，几乎都是酶的竞争性抑制剂，它们分别抑制四氢叶酸、脱氧胸苷酸及嘌呤核苷酸的合成，达到抑制肿瘤生长的目的。

2. 非竞争性抑制作用的抑制剂不改变酶对底物的亲和力 有些抑制剂与酶活性中心外的必需基团相结合，不影响酶与底物的结合，酶和底物的结合也不影响酶与抑制剂的结合。底物和抑制剂之间无竞争关系。但酶-底物-抑制剂复合物（ESI）不能进一步释放出产物。这种抑制作用称作非竞争性抑制作用（non-competitive inhibition）。

典型的非竞争性抑制作用的反应式是：

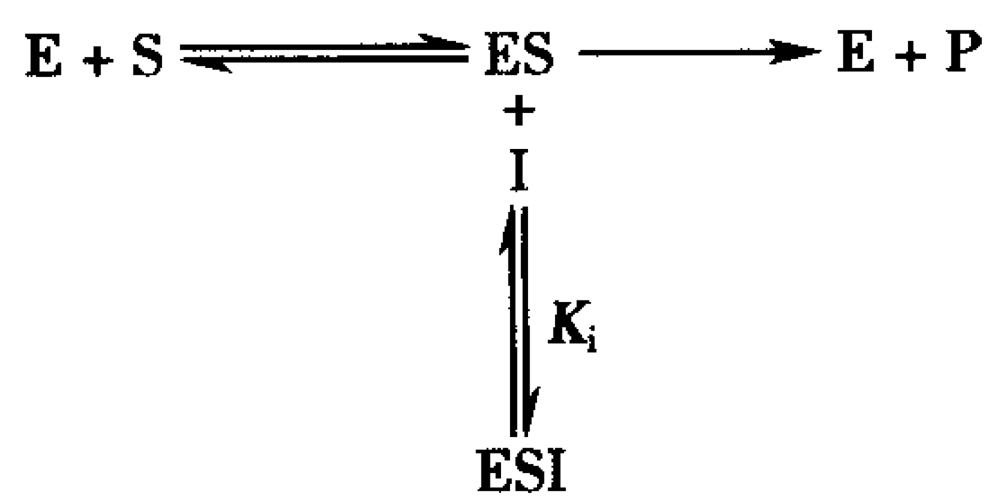


按照米氏方程式的推导方法，得出酶促反应速率、底物浓度和抑制剂之间的动力学关系，其双倒数方程式是：

$$\frac{1}{V}=\frac{K_m}{V_{max}}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)$$

以 1/[S]对 1/V 作图（图 3-10），可发现非竞争性抑制作用的图形是具有各种不同斜率的直线，抑制剂浓度增加时各直线在纵轴上的截距均增大，这说明酶促反应的 V_{max}因抑制剂的存在而降低，降低的幅度与抑制剂的浓度相关；无论抑制剂的浓度如何，各直线在横轴上的截距均与无抑制剂时相同。这说明非竞争性抑制作用不改变酶促反应的表观 K_m 值。

3. 反竞争性抑制作用的抑制剂仅与酶-底物复合物结合　此类抑制剂与上述两种抑制作用不同，仅与酶和底物形成的中间产物（ES）结合，使中间产物 ES 的量下降。这样，既减少从中间产物转化为产物的量，也同时减少从中间产物解离出游离酶和底物的量。这种抑制作用称为反竞争性抑制作用（uncompetitive inhibition），其抑制作用的反应式如下：

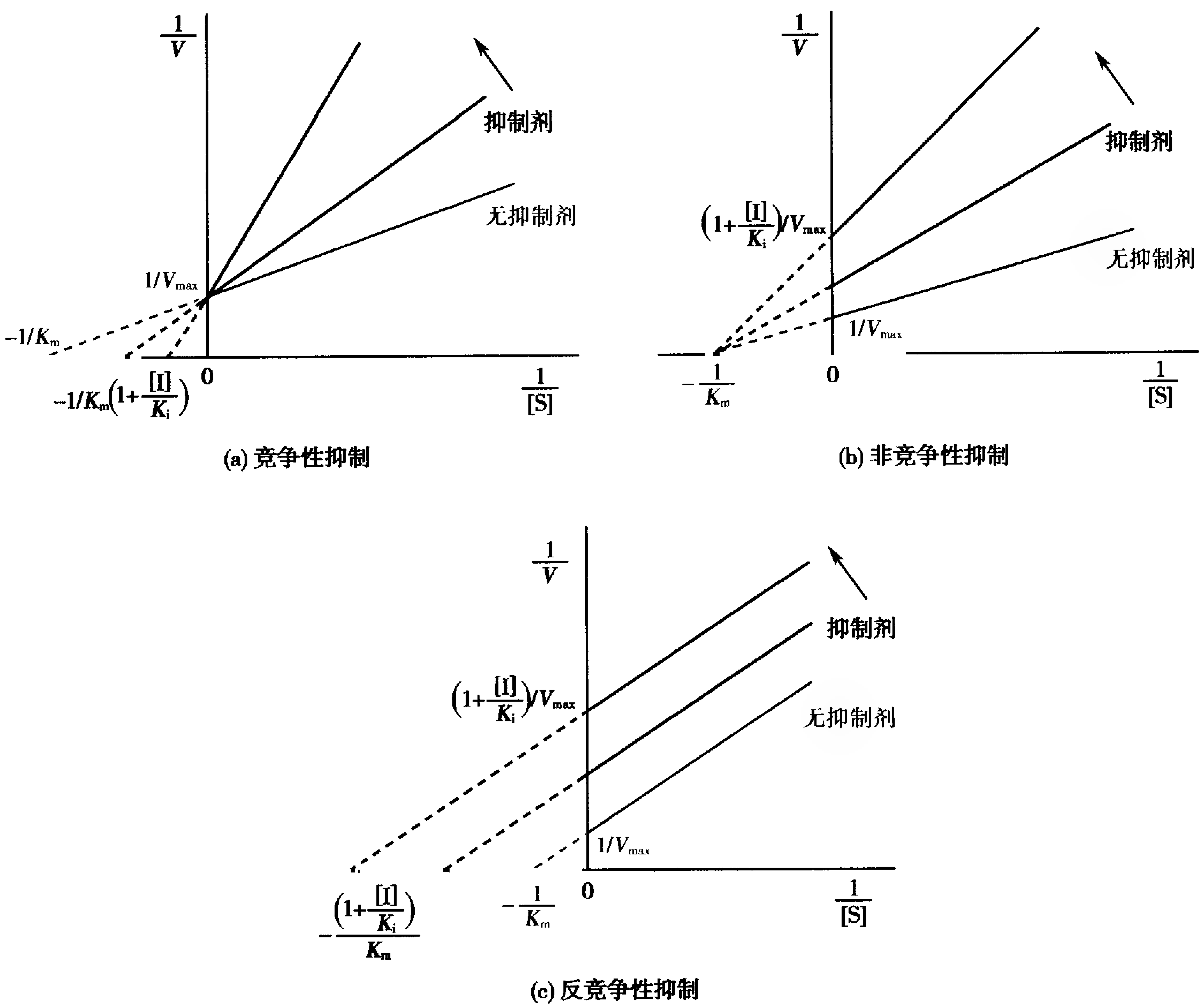


其双倒数方程式是：

$$\frac{1}{V}=\frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)$$

从反竞争性抑制作用的双倒数作图（图 3-10）可见，此类抑制作用同时降低反应的 V_{max} 和表观 K_m 值。

现将三种可逆性抑制作用总结于表 3-5。



● 图 3-10　三种可逆性抑制作用的特征曲线

表 3-5 各种可逆性抑制作用的比较

作用特征	无抑制剂	竞争性抑制	非竞争性抑制	反竞争性抑制
与I结合的组分		E	E、ES	ES
动力学参数				
表观 K_m	K_m	增大	不变	减小
最大速率	V_{max}	不变	降低	降低
林-贝氏作图				
斜率	K_m/V_{max}	增大	增大	不变
纵轴截距	$1/V_{max}$	不变	增大	增大
横轴截距	$-1/K_m$	增大	不变	减小

六、激活剂可加快酶促反应速率

使酶由无活性变为有活性或使酶活性增加的物质称为酶的激活剂（activator）。激活剂大多为金属离子，如 Mg^{2+}、K^+、Mn^{2+} 等；少数为阴离子，如 Cl^- 等。也有许多有机化合物激活剂，如胆汁酸盐等。

大多数金属离子激活剂对酶促反应是不可缺少的，否则将测不到酶的活性。这类激活剂称为必需激活剂（essential activator）。它们与酶、底物或酶-底物复合物结合参加反应，但不转化为产物。例如，己糖激酶催化的反应中，Mg^{2+} 与底物 ATP 结合生成 Mg^{2+}-ATP，后者作为酶的真正底物参加反应。有些激活剂不存在时，酶仍有一定的催化活性，这类激活剂称为非必需激活剂（non-essential activator）。非必需激活剂通过与酶或底物或酶-底物复合物结合，提高酶的催化活性。氯离子是唾液淀粉酶的非必需激活剂。许多有机化合物激活剂也属于此列。

第四节 酶的调节

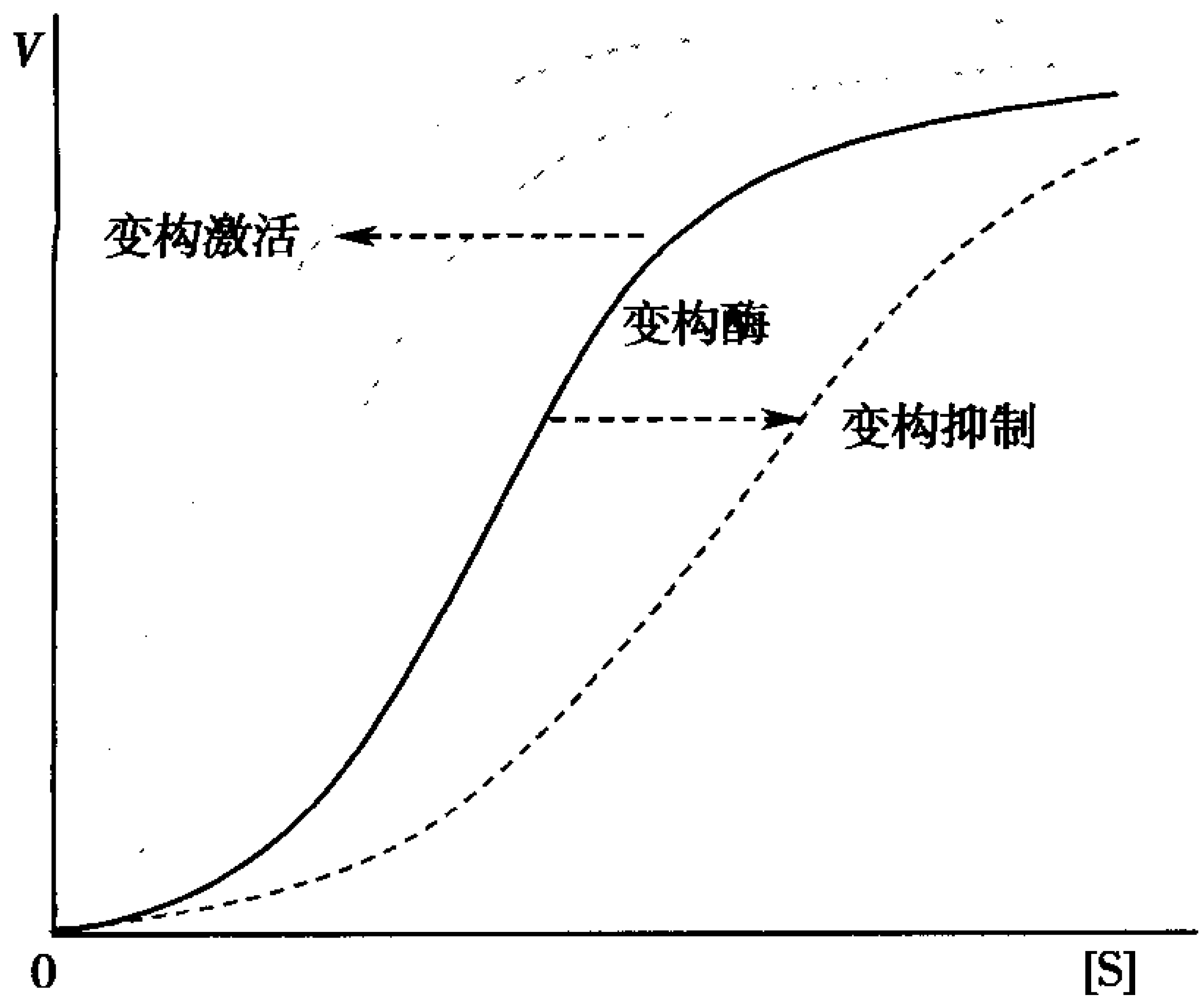
一、调节酶实现对酶促反应速率的快速调节

(一) 变构酶通过变构调节酶的活性

第一章阐述了血红蛋白的变构现象，生物体内许多酶也具有类似的变构现象。体内一些代谢物常对其代谢途径中前 1～2 个关键酶起反馈调节作用。这些代谢物与关键酶分子活性中心外的某个部位可逆地结合，使酶发生变构而改变其催化活性。酶分子中的这些结合部位称为变构部位（allosteric site）或调节部位（regulatory site）。对酶催化活性的这种调节方式称为变构调节（allosteric regulation）。受变构调节的酶称作变构酶或别构酶（allosteric enzyme）。导致变构效应的代谢物称作变构效应剂（allosteric effector）。有时底物本身就是变构效应剂。

变构酶分子中常含有多个（偶数）亚基，酶分子的催化部位（活性中心）和调节部位有的在同一亚基内，也有的不在同一亚基。含催化部位的亚基称为催化亚基；含调节部位的亚基称为调节亚基。具有多亚基的变构酶也与血红蛋白一样，存在着协同效应，包括正协同效应和负协同效应。如果效应剂与酶的一个亚基结合，此亚基的变构效应使相邻亚基也发生变构，并增加对此效应剂的亲和力，则此协同效应称为正协同效应；如果后续亚基的变构降低对此效应剂的亲和力，则此协同效应称为负协同效应。如果效应剂是底物本

身，则正协同效应的底物浓度曲线为S形曲线（图3-11）。可见，变构酶不遵守米氏动力学原则。



● 图3-11 变构酶的S形曲线
变构激活作用使变构酶的S形曲线左移，变构抑制作用使S形曲线右移

如果某效应剂引起的协同效应使酶对底物的亲和力增加，从而加快反应速率，此效应称为变构激活效应；该效应剂称为变构激活剂（allosteric activator）。反之，降低反应速率者称为变构抑制剂（allosteric inhibitor）。酶的变构调节是体内代谢途径的重要快速调节方式之一。

（二）酶的化学修饰调节是通过某些化学基团与酶的共价结合与分离实现的

酶蛋白肽链上的一些基团可与某种化学基团发生可逆的共价结合，从而改变酶的活性，这一过程称为酶的化学修饰（chemical modification）或共价修饰（covalent modification）。在化学修饰过程中，酶发生无活性（或低活性）与有活性（或高活性）两种形式的互变。这种互变实际上是由两种催化不可逆反应的酶所催化的。它们又受激素的调控。酶的化学修饰包括磷酸化与脱磷酸化、乙酰化与脱乙酰化、甲基化与脱甲基化、腺苷化与脱腺苷化，以及—SH与—S—S—的互变等。其中以磷酸化修饰最为常见（见第九章）。酶的化学修饰是体内快速调节的另一种重要方式。

（三）酶原的激活使无活性的酶原转变成有催化活性的酶

有些酶在细胞内合成或初分泌，或在其发挥催化功能前只是酶的无活性前体，必须在一定条件下，这些酶的前体水解开一个或几个特定的肽键，致使构象发生改变，表现出酶的活性。这种无活性酶的前体称作酶原（zymogen，proenzyme）。酶原向酶的转化过程称为酶原的激活。酶原的激活实际上是酶的活性中心形成或暴露的过程。

胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、羧基肽酶、弹性蛋白酶在它们初分泌时都是以无活性的酶原形式存在的，在一定条件下水解掉一个或几个短肽，转化成相应的酶。例如，胰蛋白酶原进入小肠后，在Ca^{2+}存在下受肠激酶的激活，第6位赖氨酸残基与第7位异亮氨酸残基之间的肽键被切断，水解掉一个六肽，分子的构象发生改变，形成酶的活性中心，从而成为有催化活性的胰蛋白酶。消化管内蛋白酶原的激活具有级联反应性质。胰蛋白酶原被肠激酶激活后，生成的胰蛋白酶除了可以自身激活外，还可进一步激活胰凝乳蛋白酶原、羧基肽酶原A和弹性蛋白酶原，从而加速对食物的消化过程。

血液中凝血与纤维蛋白溶解系统的酶类也都以酶原的形式存在，它们的激活具有典型的级联反应性质（见第十六章血液生物化学）。只要少数凝血因子被激活，便可通过瀑布式的放大作用，迅速使大量的凝血酶原转化为凝血酶，引发快速而有效的血液凝固。纤维蛋白溶解系统也是如此。

酶原的激活具有重要的生理意义。消化管内蛋白酶以酶原形式分泌，不仅保护消化器官本身不受酶的水解破坏，而且保证酶在其特定的部位与环境发挥其催化作用。此外，酶原还可以视为酶的贮存形式。如凝血和纤维蛋白溶解酶类以酶原形式在血液循环中运行，一旦需要便不失时机地转化为有活性的酶，发挥其对机体的保护作用。

二、酶含量的调节包括对酶合成与分解速率的调节

(一) 酶蛋白合成可被诱导或阻遏

酶蛋白合成的调节是对编码酶基因表达的调节。某些底物、产物、激素、药物等可以影响一些酶的生物合成。一般在转录水平上促进酶生物合成的作用称为诱导作用(induction);在转录水平上减少酶生物合成的作用称为阻遏作用(repression)。由于诱导剂在诱导酶生物合成过程的转录后,还需要翻译和翻译后加工等过程,所以其效应出现较迟,一般需要几个小时以上才能见效。然而,一旦酶被诱导合成以后,即使去除诱导因素,酶的活性仍然存在。可见,酶的诱导与阻遏作用是对代谢的缓慢而长效的调节。

(二) 酶的降解与一般蛋白质降解途径相同

酶是机体的组成成分,也在不断地自我更新。细胞内的各种酶均具有最稳定的分子构象。一旦此构象受到破坏,酶便被细胞内的蛋白水解酶所识别,极易降解成氨基酸。酶的降解速率与酶的结构密切相关。许多因素影响酶的降解,酶的N-末端被置换、磷酸化、突变、被氧化、酶发生变性等因素均可能成为酶被降解的标记,易受蛋白水解酶的攻击。细胞内酶的降解速率也与机体的营养和激素的调节有关。酶的降解大多在细胞内进行。细胞内存在两种蛋白质降解途径。溶酶体蛋白酶降解途径(不依赖ATP的降解途径)是在溶酶体内酸性条件下,多种蛋白酶把吞入溶酶体的蛋白质进行无选择的水解。这一途径主要水解细胞外来的蛋白质和长半寿期的蛋白质。非溶酶体蛋白酶降解途径(又称依赖ATP和泛素的降解途径)则在胞液中对细胞内的异常蛋白和短半寿期的蛋白质进行泛素标记,然后被蛋白酶所水解。在肝细胞中,前种途径约占40%,后者占60%。有关这方面的详细内容请见第八章。

第五节 酶的分类与命名

一、酶可根据其催化的反应类型予以分类

根据酶反应的类型,酶可分为六大类,其排序如下。

1. 氧化还原酶类(oxidoreductases) 催化底物进行氧化还原反应的酶类,包括转移电子、氢的反应和分子氧参加的反应。常见的例子有脱氢酶、氧化酶、还原酶、过氧化物酶等。

2. 转移酶类(transferases) 催化底物之间进行某些基团(如乙酰基、甲基、氨基、磷酸基等)的转移或交换的酶类。例如,甲基转移酶、氨基转移酶、乙酰转移酶、转硫酶、激酶和多聚酶等。

3. 水解酶类(hydrolases) 催化底物发生水解反应的酶类。例如,淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、磷酸酶、糖苷酶等。

4. 裂解酶类(或裂合酶类,lyases) 催化从底物(非水解)移去一个基团并留下双键的反应或其逆反应的酶类。例如,脱水酶、脱羧酶、碳酸酐酶、醛缩酶、柠檬酸合酶等。许多裂解酶催化逆反应,使两底物间形成新化学键并消除一个底物中的双键。合酶(synthase)便属此类。

5. 异构酶类(isomerases) 催化各种同分异构体、几何异构体或光学异构体之间相互转化的酶类。例如,异构酶、表构酶、消旋酶等。

6. 合成酶类(synthetases)(或连接酶类,ligases) 催化两分子底物合成为一分子化

合物，同时偶联有 ATP 的磷酸键断裂释能的酶类。例如，谷氨酰胺合成酶、DNA 连接酶、氨基酸：tRNA 连接酶以及依赖生物素的羧化酶等。

国际系统分类法除按上述六类将酶依次编号外，还根据酶所催化的化学键的特点和参加反应的基团不同，将每一大类又进一步分类。每种酶的分类编号均由四组数字组成，数字前冠以 EC（enzyme commission）（表 3-6）。编号中第一个数字表示该酶属于六大类中的哪一类；第二组数字表示该酶属于哪一亚类；第三组数字表示亚-亚类；第四组数字是该酶在亚-亚类中的排序。

二、每一种酶均有其系统名称和推荐名称

过去，酶的命名缺乏系统的规则，酶的名称多由发现者确定。虽然这些习惯名称多根据酶所催化的底物、反应的性质以及酶的来源而定，但常出现混乱。有的名称（如心肌黄酶、触酶等）完全不能说明酶促反应的本质。为了克服习惯名称的弊端，国际生物化学与分子生物学学会（IUBMB）以酶的分类为依据，于 1961 年提出系统命名法。系统命名法规定每一个酶都有一个系统名称（systematic name），它标明酶的所有底物与反应性质。底物名称之间以“:”分隔。由于许多酶促反应是双底物或多底物反应，且许多底物的化学名称太长，这使许多酶的系统名称过长和过于复杂。为了应用方便，国际酶学委员会又从每种酶的数个习惯名称中选定一个简便实用的推荐名称（recommended name）。现将一些酶的系统名称和推荐名称举例列于表 3-6。

表 3-6 一些酶的分类与命名

酶的分类	催化的化学反应举例	系统名称	EC 编号	推荐名称
氧化还原酶类	乙醇+NAD^+ ⇌ 乙醛+NADH+H^+	乙醇：NAD^+ 氧化还原酶	EC 1.1.1.1	乙醇脱氢酶
转移酶类	L-天冬氨酸+α-酮戊二酸 ⇌ 草酰乙酸+L-谷氨酸	L-天冬氨酸：α-酮戊二酸氨基转移酶	EC 2.6.1.1	天冬氨酸转氨酶
水解酶类	D-葡糖-6-磷酸+H_2O ⇌ D-葡萄糖+H_3PO_4	D-葡糖-6-磷酸水解酶	EC 3.1.3.9	葡糖 6-磷酸酶
裂解酶类	酮糖-1-磷酸 ⇌ 磷酸二羟丙酮+醛	酮糖-1-磷酸裂解酶	EC 4.1.2.7	醛缩酶
异构酶类	D-葡糖-6-磷酸 ⇌ D-果糖-6-磷酸	D-葡糖-6-磷酸酮-醇异构酶	EC 5.3.1.9	磷酸果糖异构酶
连接酶类	L-谷氨酸+ATP+NH_3 ⇌ L-谷氨酰胺+ADP+磷酸	L-谷氨酸：氨连接酶	EC 6.3.1.2	谷氨酰胺合成酶

第六节 酶与医学的关系

一、酶和疾病密切相关

（一）酶的质、量与活性的异常均可引起某些疾病

有些疾病的发病机制直接或间接和酶的异常或酶活性受到抑制相关。现已发现 140 多种先天性代谢缺陷中，多由酶的先天性或遗传性缺损所致。例如，酪氨酸酶缺乏引起白化

病。苯丙氨酸羟化酶缺乏使苯丙氨酸和苯丙酮酸在体内堆积，高浓度的苯丙氨酸可抑制5-羟色胺的生成，导致精神幼稚化。

许多疾病也可引起酶的异常，这种异常又使病情加重。例如，急性胰腺炎时，胰蛋白酶原在胰腺中被激活，造成胰腺组织被水解破坏。许多炎症都可以导致弹性蛋白酶从浸润的白细胞或巨噬细胞中释放，对组织产生破坏作用。

激素代谢障碍或维生素缺乏可引起某些酶的异常。例如，维生素K缺乏时，凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ的前体不能在肝内进一步羧化生成成熟的凝血因子，病人表现出因这些凝血因子质的异常所导致的临床征象。

酶活性受到抑制多见于中毒性疾病。例如，前述的有机磷农药中毒、重金属盐中毒以及氰化物中毒等。

（二）酶的测定有助于对许多疾病的诊断

1. 酶活性测定和酶活性单位是定量酶的基础　酶活性测定的目的是了解组织提取液、体液或纯化的酶液中酶的存在与多寡。由于酶蛋白的含量甚微，且又多与其他蛋白质混合存在，很难直接测定其蛋白质的含量。酶的活性是指酶催化化学反应的能力，酶的活性单位是衡量酶活力大小的尺度，它反映在规定条件下，酶促反应在单位时间内生成一定量的产物或消耗一定数量的底物所需的酶量。为了统一标准，国际生化学会（IUB）酶学委员会于1976年规定：在特定的条件下，每分钟催化1μmol底物转化为产物所需的酶量为一个国际单位（IU）。1979年该学会又推荐以催量单位（katal）来表示酶的活性。1催量（1kat）是指在特定条件下，每秒钟使1mol底物转化为产物所需的酶量。$1IU = 16.67 \times 10^{-9}$kat。

2. 血清酶对某些疾病的诊断具有更重要的价值　许多组织器官的疾病常表现为血液中一些酶活性的异常。正常情况下，在组织细胞内发挥催化作用的酶在血清中含量甚微。只有组织器官受损造成细胞破坏或细胞膜通透性增高时，细胞内的某些酶可大量释放入血；细胞的转换率增高或细胞的增殖增快，其特异的标志酶可释放入血，以及细胞内酶的合成或诱导增强或酶的清除受阻也可引起血清酶的活性增高。表3-7列出几种疾病时血清一些酶活性的改变。

表3-7　一些疾病时血清酶水平的改变

血清酶	酶水平的改变							其他
	病毒性肝炎	胆管阻塞	肌营养障碍	急性心肌梗死	急性胰腺炎	肿瘤转移到 肝	肿瘤转移到 骨	
胆碱酯酶	↓↓	-或↓		-	-	↓↓	-	有机磷化合物中毒
丙氨酸转氨酶	↑↑↑	↑	-或↑	-或↑	-	↑	-	
天冬氨酸转氨酶	↑↑↑	↑	↑	↑↑	-	↑↑	-	
碱性磷酸酶	↑	↑↑↑	-	-	-	↑↑	↑↑↑	骨疾病，骨折
酸性磷酸酶	-	-	-	-	-	-	-或↑	前列腺癌
乳酸脱氢酶	↑	↑	↑↑	↑↑	-	↑↑↑	-或↑	巨成红细胞性贫血
肌酸激酶	-	-	↑↑↑	↑↑	-		-	
脂酶	-	-	-	-	↑↑↑	-	-	小肠穿孔
淀粉酶	-	-	-	-	↑↑↑	-	-	
γ-谷氨酰转移酶	↑	↑↑↑	-	-	-	↑↑	-	

↑：酶活性增高；↓：酶活性降低；-：酶活性无变化

（三）酶和某些疾病的治疗关系密切

许多药物可通过抑制生物体内的某些酶来达到治疗目的。凡能抑制细菌重要代谢途径中的酶活性，便可达到抑菌目的。前述的磺胺类药物是细菌二氢叶酸合成酶的竞争性抑制

剂。氯霉素可抑制某些细菌转肽酶的活性从而抑制其蛋白质的合成。

肿瘤细胞有其独特的代谢方式。人们试图阻断相应的酶活性，以达到遏制肿瘤生长的目的。前述的甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤等都是核酸代谢途径中相关酶的竞争性抑制剂。

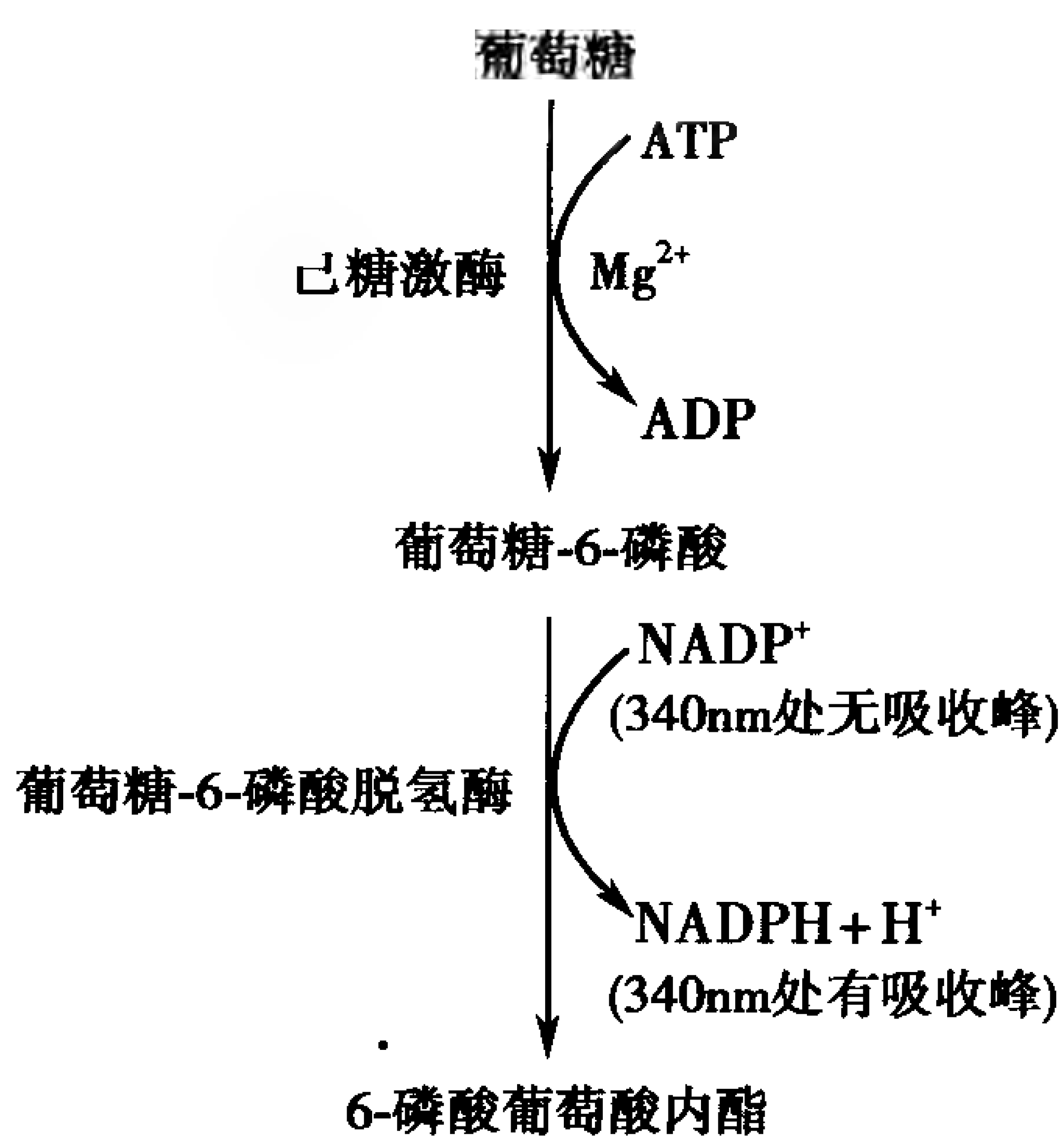
酶还可以直接用于治疗目的。酶作为药品最早用于助消化。现在已扩大到消炎、抗凝、促凝、降压等方面。例如，利用胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰脂肪酶、胰淀粉酶等助消化；利用胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、链激酶、尿激酶、纤溶酶、溶菌酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等进行外科扩创、化脓伤口的净化、浆膜粘连的防治和一些炎症的治疗；利用链激酶、尿激酶、纤溶酶等防治血栓的形成等。

二、酶在医学上的应用领域广泛

(一) 酶作为试剂用于临床检验和科学研究

1. 酶法分析是以酶作为工具对化合物和酶活性进行定量分析的一种方法 酶法分析即酶偶联测定法（enzyme coupled assays）是利用酶作为分析试剂，对一些酶的活性、底物浓度、激活剂、抑制剂等进行定量分析的一种方法。此法灵敏、准确、方便、迅速，已广泛地应用于临床检验和科学研究等各领域。其原理是利用一些酶（称指示酶）的底物或产物可以直接简便地监测，将该酶偶联到待测的酶促反应体系中，将本来不易直接测定的反应转化为可以直接监测的系列反应。

例如，很多脱氢酶所催化的反应需要 NAD^+ 或 $NADP^+$ 作辅酶。还原型辅酶（NADH 和 NADPH）在波长 340nm 处有吸收峰，而氧化型（NAD^+ 和 $NADP^+$）无此吸收峰。利用此特性，将脱氢酶反应与待测的酶促反应相偶联，以检测后者的酶活性。例如，测定己糖激酶的活性时，可利用葡糖-6-磷酸脱氢酶做指示酶，于 340nm 波长处监测 NADPH 量的增加速率，从而计算己糖激酶的活性。



2. 酶标记测定法是酶学与免疫学相结合的一种测定方法 酶标记测定法是利用酶检测的敏感性对无催化活性的蛋白质进行检测的一种方法。酶可以代替同位素与某些物质相结合，从而使该物质被酶所标记。通过测定酶的活性来判断被其定量结合的物质的存在和含量。当前应用最多的是酶联免疫测定法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。该法将待测蛋白质（抗原）的抗体共价连接于“报告酶（reporter enzyme)”，形成抗体-酶复合物。常用的酶有碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶等，这些酶的产物很容易

通过吸光度或荧光改变进行检测。样品中的抗原与抗体-酶复合物定量结合形成抗原-抗体-酶三元复合物，所以此三元复合物中酶的活性便可用来表示抗原的量。

3. 工具酶广泛地应用于分子克隆领域 除上述酶偶联测定法外，人们利用酶具有高度特异性的特点，将酶作为工具，在分子水平上对某些生物大分子进行定向的分割与连接。最典型的例子是在基因工程中应用的各种限制性内切核酸酶、连接酶以及聚合酶链反应中应用的热稳定 DNA 聚合酶等。

（二）酶的分子工程是方兴未艾的酶工程学

酶分子工程主要是利用物理、化学或分子生物学方法对酶分子进行改造，包括对酶分子中功能基团进行化学修饰、酶的固定化、抗体酶等等，以适应医药业、工业、农业等的某种需要。

1. 固定化酶是固相酶 固定化酶（immobilized enzyme）是将水溶性酶经物理或化学方法处理后，成为不溶于水但仍具有酶活性的酶衍生物。固定化酶在催化反应中以固相状态作用于底物，并保持酶的高度特异性和催化的高效率。固定化酶的优点在于它有类似离子交换树脂和亲和层析样的优点，其机械性强，可以用装柱的方式作用于流动相中的底物，使反应管道化、连续化和自动化。反应后可与产物自然分开，利于产物回收。固定化酶稳定性较好，可以反复长期应用，并有利于贮存。

2. 抗体酶是具有酶活性的抗体 前面已经提到，底物和酶的活性中心结合时底物发生构象改变，产生过渡态。如果将底物的过渡态类似物作为抗原，注入动物体内产生抗体，则抗体在结构上与过渡态类似物互相适应并可相互结合。该抗体便具有能催化该过渡态反应的酶活性。当抗体和底物结合时，就可使底物转变为过渡态进而发生催化反应。人们将这种具有催化功能的抗体分子称为抗体酶（abzyme）。

抗体酶研究是酶工程研究的前沿之一。制造抗体酶的技术比蛋白质工程甚至比生产酶制剂简单，又可大量生产。因此，可通过抗体酶的途径来制备自然界不存在的新酶种，生产目前尚不易获得的各种酶类。

小　　结

酶是对其特异底物起高效催化作用的蛋白质和核酸，以前者为主。单纯酶是仅由氨基酸残基组成的蛋白质，结合酶除含有蛋白质部分外，还含有非蛋白质辅助因子。辅助因子是金属离子或小分子有机化合物，后者称为辅酶。其中与酶蛋白共价紧密结合的辅酶又称为辅基。许多 B 族维生素参与辅酶或辅基的组成。

酶分子中一些在一级结构上可能相距很远的必需基团，在空间结构上彼此靠近，组成具有特定空间结构的区域，能与底物特异结合并将底物转化为产物，这一区域称为酶的活性中心。酶促反应具有高效率、高度特异性和可调节性。酶与底物诱导契合形成酶一底物复合物，通过邻近效应、定向排列、表面效应使底物容易转变成过渡态。酶通过多元催化发挥高效催化作用。

同工酶是指催化相同化学反应，酶蛋白的分子结构、理化性质乃至免疫学性质不同的一组酶，是由不同基因编码的多肽链，或同一基因转录生成的不同 mRNA 所翻译的不同多肽链组成的蛋白质。同工酶在不同的组织与细胞中具有不同的特点。

酶促反应动力学研究影响酶促反应速率及其影响因素，包括底物浓度、酶浓度、温度、pH、抑制剂和激活剂等。底物浓度对反应速率的影响可用米氏方程式 $V=\frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]}$ 表示。其中，K_m 为米氏常数，等于反应速率为最大速率一半时的底物浓度，具有重要意

义。V_{max}和 K_m 可用米氏方程式的双倒数作图来求取。酶促反应在最适 pH 和最适温度时活性最高，但它们不是酶的特征性常数，受许多因素的影响。酶的抑制作用包括不可逆性抑制与可逆性抑制两种。可逆性抑制中，竞争性抑制作用的表观 K_m 值增大，V_{max}不变；非竞争性抑制作用的 K_m 值不变，V_{max}减小，反竞争性抑制作用的 K_m 值和 V_{max}均降低。

机体内对酶活性与含量的调节是调节代谢的重要途径。变构酶是与一些效应剂可逆地结合，通过改变酶的构象而影响其活性的一组酶。多亚基的变构酶具有协同效应。酶的化学修饰使酶在相关酶的催化下可逆地共价结合某些化学基团，实现有活性酶和无活性酶的互变。酶的变构调节和酶的化学修饰是体内快速调节酶活性的重要方式。体内有些酶以无活性的酶原形式存在，只有在需要发挥作用时才转化为有活性的酶。

酶可分为六大类，分别是氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂合酶类、异构酶类和连接酶类（合成酶类）。酶的名称包括系统名称和推荐名称。酶的国际单位是：在规定条件下，一分钟催化 1μmol 底物转化为产物所需的酶量。

酶与医学的关系十分密切。许多疾病的发生与发展和酶的异常或酶受到抑制有关，如血清酶的测定可协助某些疾病的诊断。因此酶与疾病的关系密切。酶可以作为诊断试剂对某些疾病进行诊断。酶偶联测定法、酶联免疫测定法，以及固定化酶、抗体酶等均被广泛应用于临床与其他领域。

（赵宝昌）

第二篇 物质代谢及其调节

本篇讨论体内几类重要物质的代谢过程及其调节，包括糖代谢、脂类代谢、生物氧化、氨基酸代谢、核苷酸代谢以及各种重要物质代谢的相互联系与调节规律，共六章。

生命活动的基本特征之一是生物体内各种物质按一定规律不断地进行新陈代谢，以实现生物体与外环境的物质交换、自我更新以及机体内环境的相对稳定。物质代谢包括合成代谢与分解代谢两个方面，并处于动态平衡（dynamic equilibrium）之中。物质代谢中绝大部分化学反应是在细胞内由酶催化进行的，并伴随着多种形式的能量变化。各种物质代谢之间有着广泛的联系，而且机体具有严密调节物质代谢的能力，使其构成一个统一的整体。正常的物质代谢是生命过程所必需的，而物质代谢的紊乱往往是一些疾病的重要原因。为此，物质代谢是医学生物化学的重要组成内容。

除了上述物质代谢外，有关 DNA 生物合成、RNA 生物合成及蛋白质生物合成等代谢过程及调节将在第三篇讨论。水、钠、钾等无机物代谢归入《病理生理学》。学习这一篇时，要注意掌握各类物质代谢的基本反应途径、关键酶与主要调节环节、重要生理意义、各类物质代谢的相互联系与调节规则以及代谢异常与疾病关系等问题。

第四章 糖代谢

食物中的糖是机体的一种重要的能量来源。糖在生命活动中的主要作用是提供碳源和能源。人体所需能量的 50%～70%来自于糖。1mol 葡萄糖（glucose）完全氧化成为二氧化碳和水可释放 2840kJ（679kcal/mol）的能量。其中约 34%转化为 ATP，以供应机体生理活动所需的能量。葡萄糖不仅是机体的主要供能物质，也是很多含碳物质分子的前体物质，在机体内可转变成多种非糖物质，而有些非糖物质又可转变为葡萄糖。此外，葡萄糖的某些代谢产物可为机体其他代谢途径提供必需的物质，如 NADPH、磷酸核糖等。其他的单糖如果糖（fructose）、半乳糖（galactose）、甘露糖（mannose）等所占比例很小，且主要是进入葡萄糖代谢途径中代谢。因此，本章将葡萄糖在机体内的代谢作为介绍的重点。

第一节 概 述

一、糖的主要生理功能是氧化供能

糖是人类食物的主要成分，约占食物总量的 50%以上。提供能量是糖最主要的生理功能。此外，糖还是机体重要的碳源，糖代谢的中间产物可转变成其他的含碳化合物，如氨

基酸、脂肪酸、核苷等。糖也是组成机体组织结构的重要成分。例如，蛋白聚糖（proteoglycan）和糖蛋白（glycoprotein）构成结缔组织、软骨和骨的基质；糖蛋白和糖脂（glycolipid）是细胞膜的构成成分。糖与蛋白质、脂类的聚合物还在调节细胞间或细胞与其他生物物质的相互作用中发挥着重要的作用，糖作为调节细胞相互作用的介质的优越性在于这类物质具有丰富的结构多样性。体内还有一些具有特殊生理功能的糖蛋白，如激素、酶、免疫球蛋白、血型物质和血浆蛋白等。值得指出的是，糖的磷酸衍生物可以形成许多重要的生物活性物质，如 NAD^+、FAD、DNA、RNA、ATP 等。

二、糖的消化吸收主要是在小肠进行

人类食物中的糖类主要有：植物淀粉、动物糖原、麦芽糖（maltose）、蔗糖（sucrose）、乳糖（lactose）和葡萄糖等。食物中含有的大量纤维素（cellulose），因人体内无β-糖苷酶而不能对其分解利用，但也能起到刺激肠蠕动等作用，也是维持健康所必需的糖类。食物中的糖一般以淀粉（starch）为主。唾液和胰液中都有α-淀粉酶（α-amylase），可水解淀粉分子内的α-1,4-糖苷键。由于食物在口腔停留的时间很短，所以淀粉消化主要在小肠内进行。在胰液的α-淀粉酶作用下，淀粉被水解为麦芽糖、麦芽三糖（两者约占65%）及含分支的异麦芽糖和由4～9个葡萄糖残基构成的α-临界糊精（后两者约占35%）。寡糖的进一步消化在小肠黏膜刷状缘进行。α-葡萄糖苷酶（包括麦芽糖酶）水解没有分支的麦芽糖和麦芽三糖。α-临界糊精酶（包括异麦芽糖酶）则可水解α-1,4-糖苷键和α-1,6-糖苷键，将α-临界糊精和异麦芽糖水解成葡萄糖。肠黏膜细胞还有蔗糖酶和乳糖酶等，分别水解蔗糖和乳糖。有些成人由于乳糖酶缺乏，在食用牛奶后发生乳糖消化吸收障碍，而引起腹胀、腹泻等症状。

糖被消化成单糖后才能在小肠被吸收，再经门静脉进入肝。小肠黏膜细胞对葡萄糖的摄入是一个依赖于特定载体转运的、主动耗能的过程，在吸收过程中同时伴有 Na^+ 的转运。这类葡萄糖转运体称为 Na^+ 依赖型葡萄糖转运体（Na^+-dependent glucose transporter，SGLT），它们主要存在于小肠黏膜和肾小管上皮细胞。

三、糖代谢的概况

葡萄糖吸收入血后，在体内代谢首先需进入细胞。这是依赖一类葡萄糖转运体（glucose transporter，GLUT）实现的。现已发现有5种葡萄糖转运体（GLUT 1～5），它们分别在不同的组织细胞中起作用。如 GLUT-1 主要存在于脑、肌、脂肪等组织中，GLUT-2 主要存在于肝和胰的β细胞中，而 GLUT-4 主要存在于脂肪和肌组织中。

糖代谢主要是指葡萄糖在体内的一系列复杂的化学反应。它在不同类型的细胞中代谢的途径也有所不同，其分解代谢方式还在很大程度上受供氧状况的影响：在供氧充足时，葡萄糖进行有氧氧化彻底氧化成 CO_2 和 H_2O；在缺氧时，则进行糖酵解生成乳酸。此外，葡萄糖也可进入磷酸戊糖途径等进行代谢，发挥不同的生理作用。葡萄糖也可经合成代谢聚合成糖原，储存在肝或肌组织中。有些非糖物质如乳酸、丙氨酸等还可经糖异生途径转变成葡萄糖或糖原。以下将介绍糖的主要代谢途径、生理意义及其调控机制。

第二节 糖的无氧氧化

在机体缺氧条件下，葡萄糖经一系列酶促反应生成丙酮酸进而还原生成乳酸的过程称

为糖酵解（glycolysis），亦称糖的无氧氧化（anaerobic oxidation）。在某些植物和微生物中，葡萄糖分解产生的丙酮酸可转变为乙醇和二氧化碳，此为乙醇发酵（ethanol fermentation）。本节仅讨论以生成乳酸为结局的糖的无氧氧化。

糖酵解

1897 年，德国生物化学家 E. Buchner 发现离开活体的酿酶（zymase）具有活性以后，促进了生物体内糖代谢研究的进展。科学家们很快就发现了糖酵解是生物体内普遍存在的过程。1907 年英国科学家 F. G. Hopkins 发现肌肉收缩同乳酸生成有直接关系。1935 年，生物化学家 G. G. Embden、O. Meyerhof 和 J. K. Parnas 等许多科学家经过了 20 年左右时间的研究探索，阐明了糖酵解过程的全部 12 个反应步骤。

一、糖无氧氧化反应过程分为糖酵解途径和乳酸生成两个阶段

糖酵解的第一阶段是由葡萄糖分解成丙酮酸，称为糖酵解途径（glycolytic pathway）。第二阶段为丙酮酸还原生成乳酸。糖的无氧氧化途径的全部反应在胞质中进行。

（一）葡萄糖经糖酵解途径分解为两分子丙酮酸

1. 葡萄糖磷酸化为 6-磷酸葡萄糖 葡萄糖进入细胞后发生磷酸化反应，生成 6-磷酸葡萄糖（glucose-6-phosphate，G-6-P）。磷酸化后的葡萄糖不能自由通过细胞膜而逸出细胞。催化此反应的是己糖激酶（hexokinase），需要 Mg^{2+}。这个反应的 $\Delta G^{\ominus'}$ 为－16.7kJ/mol（－4.0kcal/mol），所以是不可逆的。哺乳类动物体内已发现有 4 种己糖激酶同工酶（Ⅰ～Ⅳ型）。肝细胞中存在的是Ⅳ型，称为葡萄糖激酶（glucokinase）。它对葡萄糖的亲和力很低，K_m 值为 10mmol/L 左右，而其他己糖激酶的 K_m 值在 0.1mmol/L 左右。此酶的另一个特点是受激素调控。这些特性使葡萄糖激酶在维持血糖水平和糖代谢中起着重要的生理作用。

2. 6-磷酸葡萄糖转变为 6-磷酸果糖 这是由磷酸己糖异构酶（phosphohexose isomerase）催化的醛糖与酮糖间的异构反应。6-磷酸葡萄糖转变为 6-磷酸果糖（fructose-6-phosphate，F-6-P）是需要 Mg^{2+} 参与的可逆反应。

3. 6-磷酸果糖转变为 1,6-二磷酸果糖 这是第二个磷酸化反应，需 ATP 和 Mg^{2+}，由 6-磷酸果糖激酶-1（6-phosphofructokinase-1，PFK-1）催化，是非平衡反应，倾向于生成 1,6-二磷酸果糖（1,6-fructose-biphosphate，F-1,6-BP）。

4. 磷酸己糖裂解成 2 分子磷酸丙糖 此步反应是可逆的，由醛缩酶（aldolase）催化，而且有利于己糖的合成，所以称为醛缩酶。最终产生 2 个丙糖，即磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛。

5. 磷酸二羟丙酮转变为 3-磷酸甘油醛 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮是同分异构体，在磷酸丙糖异构酶（triose phosphate isomerase）催化下可互相转变。当 3-磷酸甘油醛在下一步反应中被移去后，磷酸二羟丙酮迅速转变为 3-磷酸甘油醛，继续进行酵解。

上述的 5 步反应为糖酵解途径中的耗能阶段，1 分子葡萄糖的代谢消耗了 2 分子 ATP，产生了 2 分子 3-磷酸甘油醛。而在以后的 5 步反应中，磷酸丙糖转变成丙酮酸，总共生成 4 分子 ATP，所以为能量的释放和储存阶段。

6. 3-磷酸甘油醛氧化为1,3-二磷酸甘油酸 反应中3-磷酸甘油醛的醛基氧化成羧基及羧基的磷酸化均由3-磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase）催化，以NAD^+为辅酶接受氢和电子。参加反应的还有无机磷酸，当3-磷酸甘油醛的醛基氧化脱氢成羧基即与磷酸形成混合酸酐。该酸酐是一高能化合物，其磷酸酯键水解时$\Delta G^{\ominus'} = -61.9kJ/mol$（$-14.8kcal/mol$），可将能量转移至ADP，生成ATP。

7. 1,3-二磷酸甘油酸转变成3-磷酸甘油酸 磷酸甘油酸激酶（phosphoglycerate kinase）催化混合酸酐上的磷酸基从羧基转移到ADP，形成ATP和3-磷酸甘油酸，反应需要Mg^{2+}。这是糖酵解过程中第一次产生ATP的反应，将底物的高能磷酸基直接转移给ADP生成ATP。这种ADP或其他核苷二磷酸的磷酸化作用与底物的脱氢作用直接相偶联的反应过程称为底物水平磷酸化作用（substrate-level phosphorylation）。磷酸甘油酸激酶催化的此反应是一可逆反应，逆反应则需消耗1分子ATP。

8. 3-磷酸甘油酸转变为2-磷酸甘油酸 磷酸甘油酸变位酶（phosphoglycerate mutase）催化磷酸基从3-磷酸甘油酸的C_3位转移到C_2，这步反应是可逆的，反应需要Mg^{2+}。

9. 2-磷酸甘油酸脱水生成磷酸烯醇式丙酮酸 烯醇化酶（enolase）催化2-磷酸甘油酸脱水生成磷酸烯醇式丙酮酸（phosphoenolpyruvate，PEP）。尽管这个反应的标准自由能改变比较小，但反应时可引起分子内部的电子重排和能量重新分布，形成了一个高能磷酸键，这就为下一步反应作了准备。

10. 磷酸烯醇式丙酮酸将高能磷酸基转移给ADP形成ATP和丙酮酸 糖酵解途径的最后这一步反应是由丙酮酸激酶（pyruvate kinase）催化的，丙酮酸激酶的作用需要K^+和Mg^{2+}参与。反应最初生成烯醇式丙酮酸，但烯醇式迅速经非酶促反应转变为酮式。在胞内这个反应是不可逆的。这是糖酵解途径中第二次底物水平磷酸化。

（二）丙酮酸被还原为乳酸

这一反应由乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）催化，丙酮酸还原成乳酸所需的氢原子由$NADH+H^+$提供，后者来自上述第6步反应中的3-磷酸甘油醛的脱氢反应。在缺氧情况下，这对氢用于还原丙酮酸生成乳酸，$NADH+H^+$重新转变成NAD^+，糖酵解才能继续进行。

糖酵解的全部反应可归纳如图4-1。

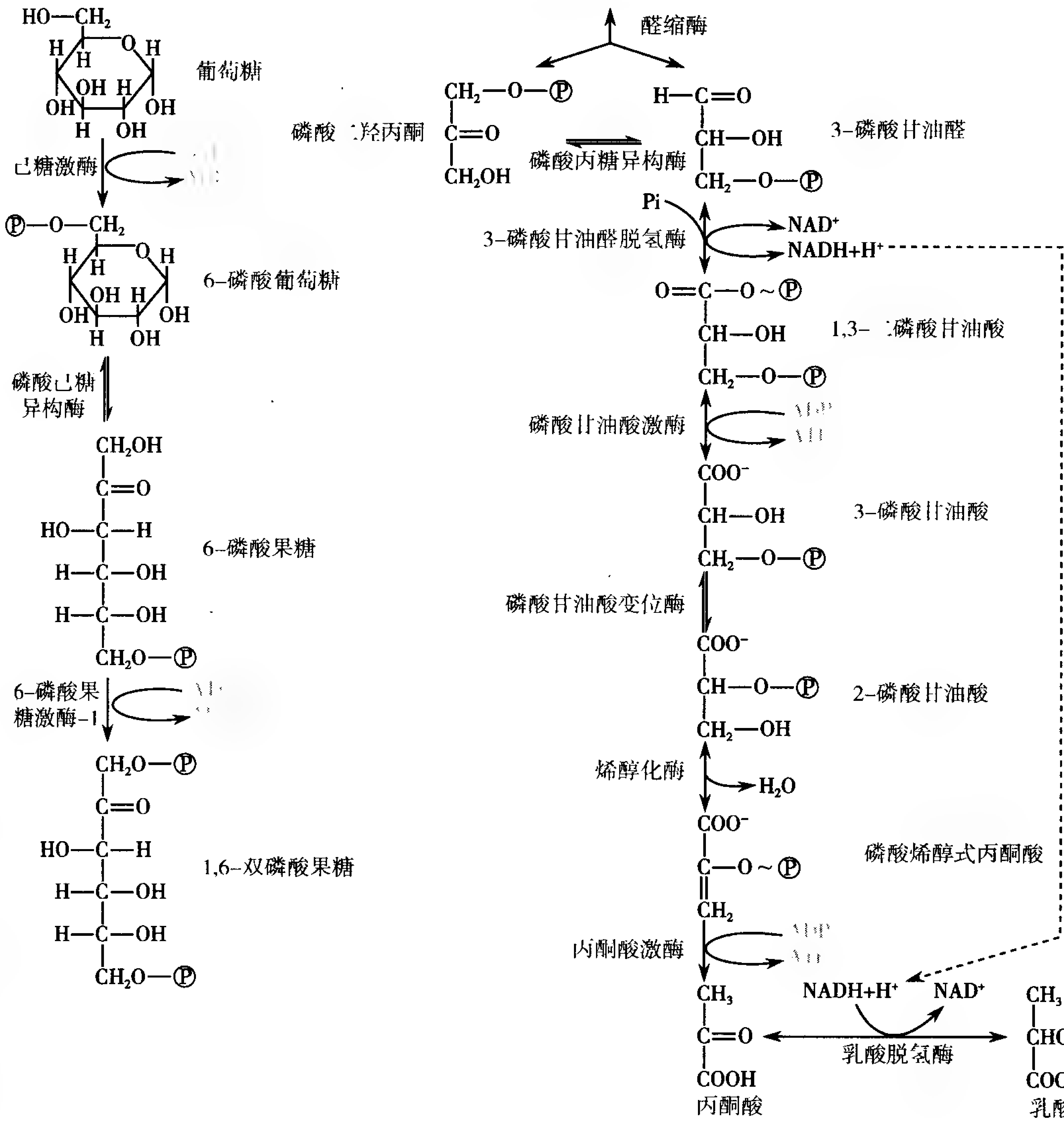
除葡萄糖外，其他已糖也可转变成磷酸已糖而进入糖酵解途径。

二、糖酵解的调控是对3个关键酶活性的调节

糖酵解中大多数反应是可逆的。这些可逆反应的方向、速率由底物和产物的浓度控制；参与这些可逆反应的酶活性的改变，并不能决定反应的方向。糖酵解途径中有3个非平衡反应：已糖激酶（葡萄糖激酶）、6-磷酸果糖激酶-1和丙酮酸激酶催化的反应。这3个反应基本上是不可逆的，是糖酵解途径流量的3个调节点，分别受变构效应剂和激素的调节。

（一）**6-磷酸果糖激酶-1**对调节糖酵解途径的流量最重要

调节糖酵解途径流量最重要的是6-磷酸果糖激酶-1的活性。6-磷酸果糖激酶-1是一个四聚体，受多种变构效应剂的影响。ATP和柠檬酸是此酶的变构抑制剂。6-磷酸果糖激酶-1有2个结合ATP的位点，一是活性中心内的催化部位，ATP作为底物结合；另一个是活性中心以外的与变构效应剂结合的部位，与ATP的亲和力较低，因而相对地需要较高浓度ATP才能与之结合使酶丧失活性。6-磷酸果糖激酶-1的变构激活剂有AMP、

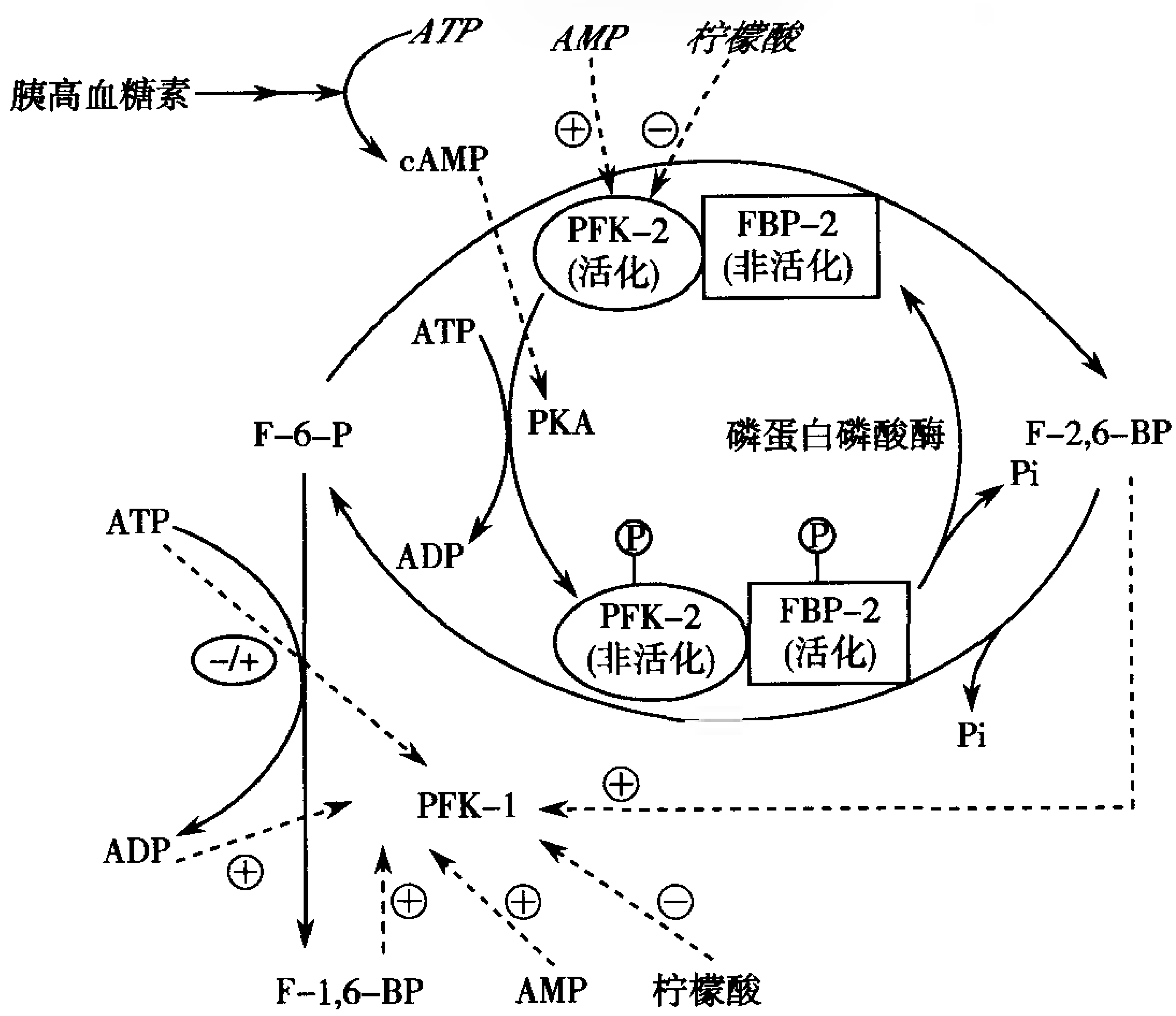


●图 4-1 糖酵解的代谢途径

ADP、1,6-二磷酸果糖和 2,6-二磷酸果糖（fructose-2,6-biphosphate，F-2,6-BP）。AMP 可与 ATP 竞争变构结合部位，抵消 ATP 的抑制作用。1,6-二磷酸果糖是 6-磷酸果糖激酶-1 的反应产物，这种产物正反馈作用是比较少见的，它有利于糖的分解。

2,6-二磷酸果糖是 6-磷酸果糖激酶-1 最强的变构激活剂，在生理浓度范围（μmol 水平）内即可发挥效应。其作用是与 AMP 一起取消 ATP、柠檬酸对 6-磷酸果糖激酶-1 的变构抑制作用。2,6-二磷酸果糖由 6-磷酸果糖激酶-2（6-phosphofructokinase-2，PFK-2）催化 6-磷酸果糖 C_2 磷酸化而成；果糖二磷酸酶-2（fructose biphosphatase-2，FBP-2）则可水解其 C_2 位磷酸，使其转变成 6-磷酸果糖（图 4-2）。6-磷酸果糖激酶-2 实际上是一种双功能酶，在酶蛋白中具有 2 个分开的催化中心，故同时具有 6-磷酸果糖激酶-2 和果糖二磷酸酶-2 活性。

6-磷酸果糖激酶-2/果糖二磷酸酶-2 还可在激素作用下，以共价修饰方式进行调节。胰高血糖素通过 cAMP 及依赖 cAMP 的蛋白激酶磷酸化 PFK-2 的 32 位丝氨酸，磷酸化后其激酶活性减弱而磷酸酶活性升高。磷蛋白磷酸酶将其去磷酸后，酶活性的变化则相反。



●图 4-2　2,6-磷酸果糖激酶-1 的活性调节

(二) 丙酮酸激酶是糖酵解的第二个重要的调节点

丙酮酸激酶是糖酵解的第二个重要的调节点。1,6-二磷酸果糖是丙酮酸激酶的变构激活剂，而 ATP 则有抑制作用。此外，在肝内，丙氨酸也有变构抑制作用。丙酮酸激酶还受共价修饰方式调节。依赖 cAMP 的蛋白激酶和依赖 Ca^{2+}、钙调蛋白的蛋白激酶均可使其磷酸化而失活。胰高血糖素可通过 cAMP 抑制丙酮酸激酶活性。

(三) 己糖激酶受到反馈抑制调节

己糖激酶受其反应产物 6-磷酸葡萄糖的反馈抑制，葡萄糖激酶分子内不存在 6-磷酸葡萄糖的变构部位，故不受 6-磷酸葡萄糖的影响。长链脂酰 CoA 对其有变构抑制作用，这在饥饿时减少肝和其他组织摄取葡萄糖有一定意义。胰岛素可诱导葡萄糖激酶基因的转录，促进酶的合成。

糖酵解是体内葡萄糖分解供能的一条重要途径。对于绝大多数组织，特别是骨骼肌，调节流量的目的是适应这些组织对能量的需求。当消耗能量多，细胞内 ATP/AMP 比例降低时，6-磷酸果糖激酶-1 和丙酮酸激酶均被激活，加速葡萄糖的分解。反之，细胞内 ATP 的储备丰富时，通过糖酵解分解的葡萄糖就减少。肝的情况不同。正常进食时，肝仅氧化少量葡萄糖，主要由氧化脂酸获得能量。进食后，胰高血糖素分泌减少，胰岛素分泌增加，2,6-二磷酸果糖的合成增加，加速糖循糖酵解途径分解，主要是生成乙酰 CoA 以合成脂酸；饥饿时胰高血糖素分泌增加，抑制了 2,6-二磷酸果糖的合成和丙酮酸激酶的活性，即抑制糖酵解，这样才能有效地进行糖异生，维持血糖水平（详见本章第六节）。

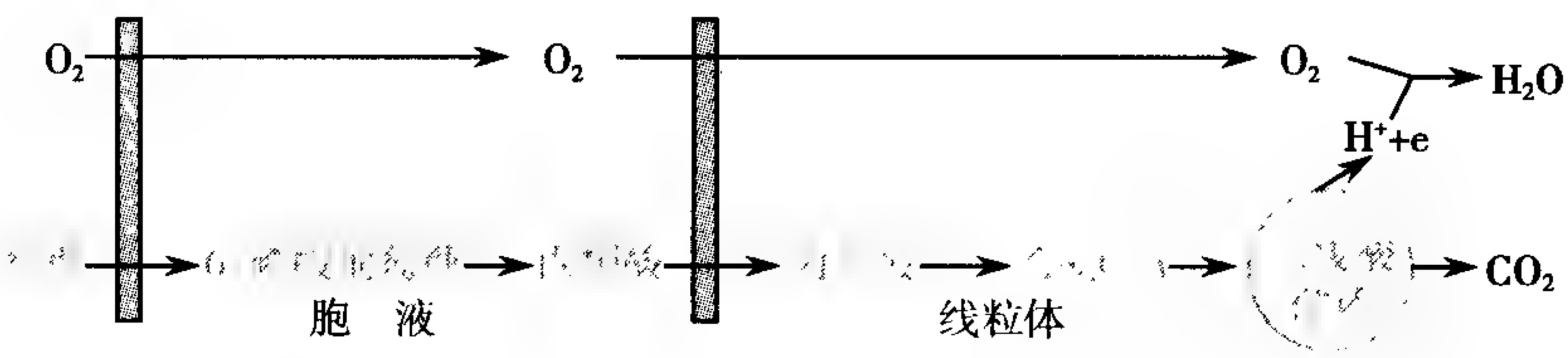
三、糖酵解的主要生理意义是在机体缺氧的情况下快速供能

糖酵解最主要的生理意义在于迅速提供能量，这对肌收缩更为重要。肌内 ATP 含量很低，仅 5～7μmol/g 新鲜组织，只要肌收缩几秒钟即可耗尽。这时即使氧不缺乏，但因葡萄糖进行有氧氧化的反应过程比糖酵解长，来不及满足需要，而通过糖酵解则可迅速得到 ATP。当机体缺氧或剧烈运动肌局部血流不足时，能量主要通过糖酵解获得。红细胞

没有线粒体，完全依赖糖酵解供应能量。神经细胞、白细胞、骨髓细胞等代谢极为活跃，即使不缺氧也常由糖酵解提供部分能量。糖酵解时每分子磷酸丙糖有 2 次底物水平磷酸化，可生成 2 分子 ATP。因此 1mol 葡萄糖可生成 4mol ATP，在葡萄糖和 6-磷酸果糖磷酸化时共消耗 2mol ATP，故净得 2mol ATP。1mol 葡萄糖经糖酵解生成 2 分子乳酸可释放 196kJ/mol（46.9kcal/mol）的能量。标准状态下 ATP 水解为 ADP 和 Pi 时 $\Delta G^{\ominus'} = -30.5$kJ/mol（$-7.29$kcal/mol），可储能 61kJ/mol（14.6kcal/mol），效率为 31%。

第三节　糖的有氧氧化

葡萄糖在有氧条件下彻底氧化成水和二氧化碳的反应过程称为有氧氧化（aerobic oxidation）。有氧氧化是糖氧化供能的主要方式，绝大多数细胞都通过它获得能量。肌组织等进行无氧分解生成的乳酸，最终仍需在有氧时彻底氧化成水和二氧化碳。糖的有氧氧化可概括如图 4-3。



●图 4-3　葡萄糖有氧氧化概况

一、糖有氧氧化的反应过程包括糖酵解途径、丙酮酸氧化脱羧、三羧酸循环及氧化磷酸化

有氧氧化大致可分为三个阶段。第一阶段葡萄糖循糖酵解途径分解成丙酮酸。第二阶段丙酮酸进入线粒体内氧化脱羧生成乙酰 CoA。第三阶段为三羧酸循环及氧化磷酸化。第一阶段的反应如前所述；氧化磷酸化将在后述章节中讨论。在此主要介绍丙酮酸的氧化脱羧和三羧酸循环的反应过程。

（一）葡萄糖循糖酵解途径分解为丙酮酸

见前述。

（二）丙酮酸进入线粒体氧化脱羧生成乙酰 CoA

丙酮酸氧化脱羧

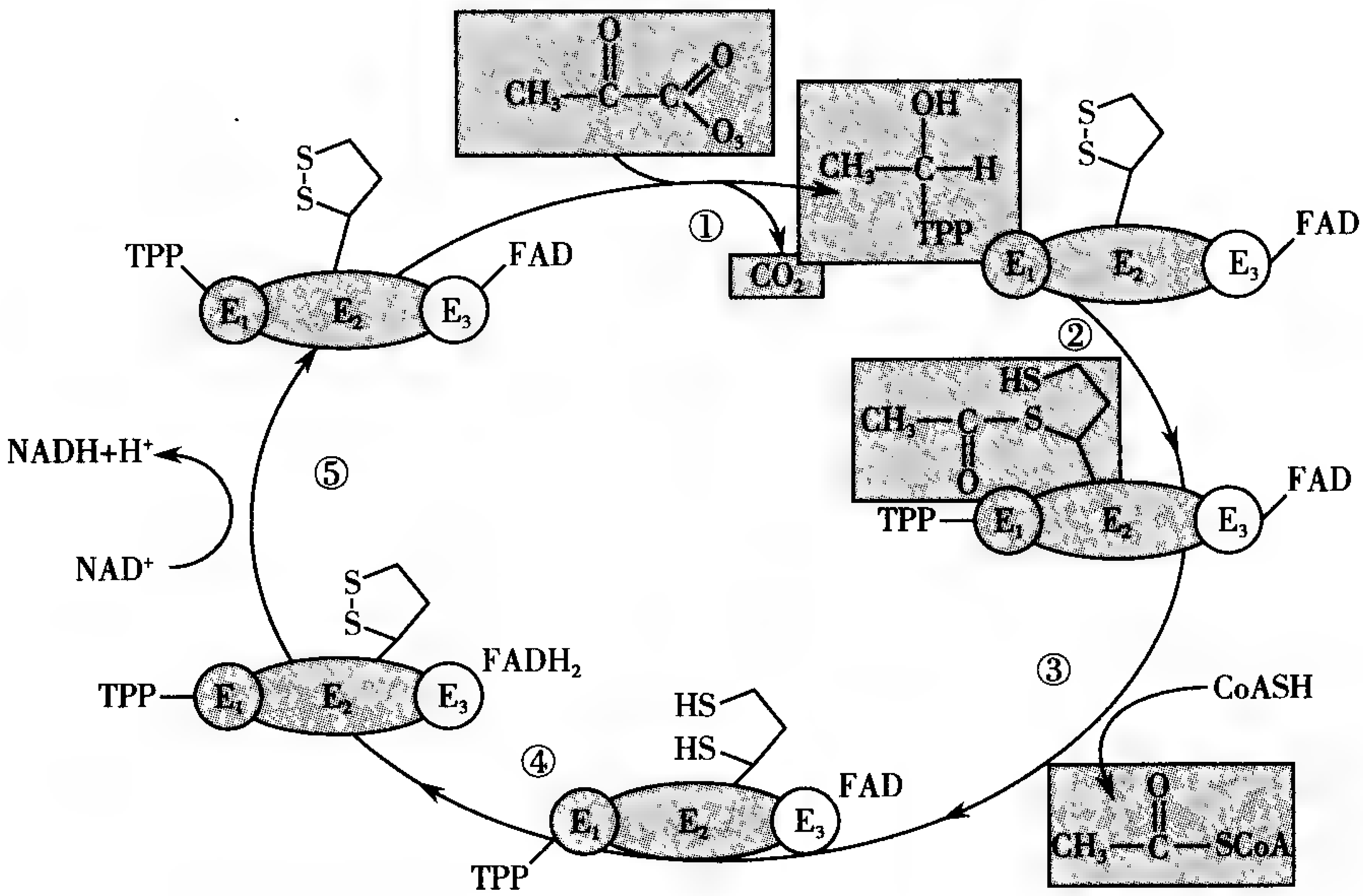
1945 年德国生物化学家 F. A. Lippmann（F. A. 李普曼）证实了 Krebs 在提出三羧酸循环反应时，对于同草酰乙酸结合的两个碳原子化合物的来源问题的设想：即它是糖酵解或脂肪酸 β-氧化的产物。F. A. Lippmann 从研究生物化学能的重要传递物——ATP 入手，发现了活性很强的能结合两个碳原子的化合物——辅酶 A。正是辅酶 A 促进了两个碳原子化合物同草酰乙酸的缩合。直到 20 世纪 50 年代初，丙酮酸氧化脱羧后同草酰乙酸缩合的整套多酶体系才最终被阐明。

丙酮酸在线粒体经过 5 步反应氧化脱羧生成乙酰 CoA（acetyl CoA）的总反应式为：

$$丙酮酸 + NAD^{+} + HS\text{-}CoA \longrightarrow 乙酰 CoA + NADH + H^{+} + CO_2$$

此反应由丙酮酸脱氢酶复合体（pyruvate dehydrogenase complex）催化。在真核细胞中，该复合体存在于线粒体中，是由丙酮酸脱氢酶（E_1），二氢硫辛酰胺转乙酰酶（E_2）和二氢硫辛酰胺脱氢酶（E_3）三种酶按一定比例组合成多酶复合体，其组合比例随生物体不同而异。在哺乳类动物细胞中，酶复合体由 60 个转乙酰酶组成核心，周围排列着 12 个丙酮酸脱氢酶和 6 个二氢硫辛酰胺脱氢酶。参与反应的辅酶有硫胺素焦磷酸酯（TPP）、硫辛酸、FAD、NAD^{+} 及 CoA。其中硫辛酸是带有二硫键的八碳羧酸，通过与转乙酰酶的赖氨酸残基的 ε-氨基相连，形成与酶结合的硫辛酰胺而成为酶的柔性长臂，可将乙酰基从酶复合体的一个活性部位转到另一个活性部位。丙酮酸脱氢酶的辅酶是 TPP，二氢硫辛酰胺脱氢酶的辅酶是 FAD、NAD^{+}。

丙酮酸脱氢酶复合体催化的反应可分 5 步描述，如图 4-4 所示。



● 图 4-4　丙酮酸脱氢酶复合体作用机制

1. 丙酮酸脱羧形成羟乙基-TPP　TPP 噻唑环上的 N 与 S 之间活泼的碳原子可释放出 H^{+}，而成为碳离子，与丙酮酸的羰基作用，产生 CO_2，同时形成羟乙基-TPP。

2. 由二氢硫辛酰胺转乙酰酶（E_2）催化使羟乙基 TPP-E_1 上的羟乙基被氧化成乙酰基，同时转移给硫辛酰胺，形成乙酰硫辛酰胺-E_2。

3. 二氢硫辛酰胺转乙酰酶（E_2）还催化乙酰硫辛酰胺上的乙酰基转移给辅酶 A 生成乙酰 CoA 后，离开酶复合体，同时氧化过程中的 2 个电子使硫辛酰胺上的二硫键还原为 2 个巯基。

4. 二氢硫辛酰胺脱氢酶（E_3）使还原的二氢硫辛酰胺脱氢重新生成硫辛酰胺，以进行下一轮反应。同时将氢传递给 FAD，生成 $FADH_2$。

5. 在二氢硫辛酰胺脱氢酶（E_3）催化下，将 $FADH_2$ 上的 H 转移给 NAD^{+}，形成 $NADH + H^{+}$。

在整个反应过程中：中间产物并不离开酶复合体，这就使得上述各步反应得以迅速完成，而且因没有游离的中间产物，所以不会发生副反应。丙酮酸氧化脱羧反应的 $\Delta G^{\ominus\prime}=$

$-39.5kJ/mol$（$-9.44kcal/mol$），故反应是不可逆的。

（三）乙酰 CoA 进入三羧酸循环以及氧化磷酸化生成 ATP

三羧酸循环的第一步是乙酰 CoA 与草酰乙酸缩合成 6 个碳原子的柠檬酸，然后柠檬酸经过一系列反应重新生成草酰乙酸，完成一轮循环。经过一轮循环，乙酰 CoA 中的 2 个碳原子被氧化成 CO_2。在循环中有 1 次底物水平磷酸化，可生成 1 分子 ATP。更为重要的是有 4 次脱氢反应，氢的接受体分别为 NAD^+ 或 FAD，生成 3 分子 $NADH+H^+$ 和 1 分子 $FADH_2$，它们既是三羧酸循环中的脱氢酶的辅酶，又是电子传递链的第一个环节。电子传递链是由一系列氧化还原体系组成，它们的功能是将 H^+ 或电子依次传递至氧，生成水。在 H^+ 或电子沿电子传递链传递过程中能量逐步释放，同时伴有 ADP 磷酸化成 ATP，吸收这些能量储存于 ATP 中，即氧化与磷酸化反应是偶联在一起的（见第六章）。

二、三羧酸循环是以形成柠檬酸为起始物的循环反应系统

三羧酸循环

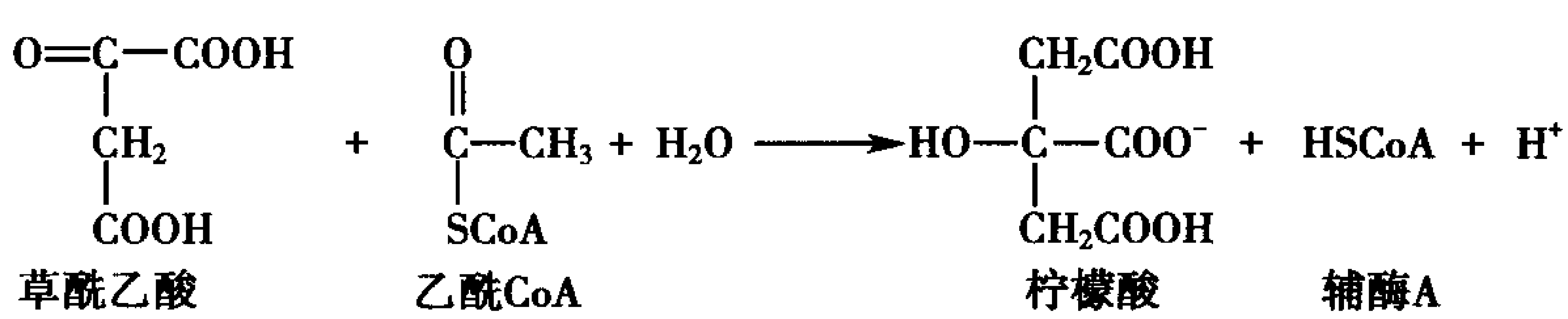
H. A. Krebs（H. A. 克雷布斯）于 20 世纪 30 年代末阐明了三羧酸循环这一代谢基本途径。他总结分析了前人在与呼吸作用有关的化学物质的化学结构及其变化和自己的实验结果后，指出：柠檬酸经过一系列的已知的变化可以变为草酰乙酸，而草酰乙酸也可以变为比它多两个碳的柠檬酸，从而提出了柠檬酸循环的设想。

三羧酸循环（tricarboxylic acid cycle，TCA cycle，TCA 循环）是一个由一系列酶促反应构成的循环反应系统，在该反应过程中，首先由乙酰 CoA（主要来自于三大营养物质的分解代谢）与草酰乙酸（oxaloacetate）缩合生成含 3 个羧基的柠檬酸（citric acid），再经过 4 次脱氢、2 次脱羧，生成 4 分子还原当量（reducing equivalent，一般是指以氢原子或氢离子形式存在的一个电子或一个电子当量）和 2 分子 CO_2，重新生成草酰乙酸的这一循环反应过程称为三羧酸循环。

TCA 循环，亦称柠檬酸循环（citric acid cycle），这是因为该循环反应中第一个中间产物是柠檬酸。由于该学说由 Krebs 正式提出，故此循环又被称为 Krebs 循环。

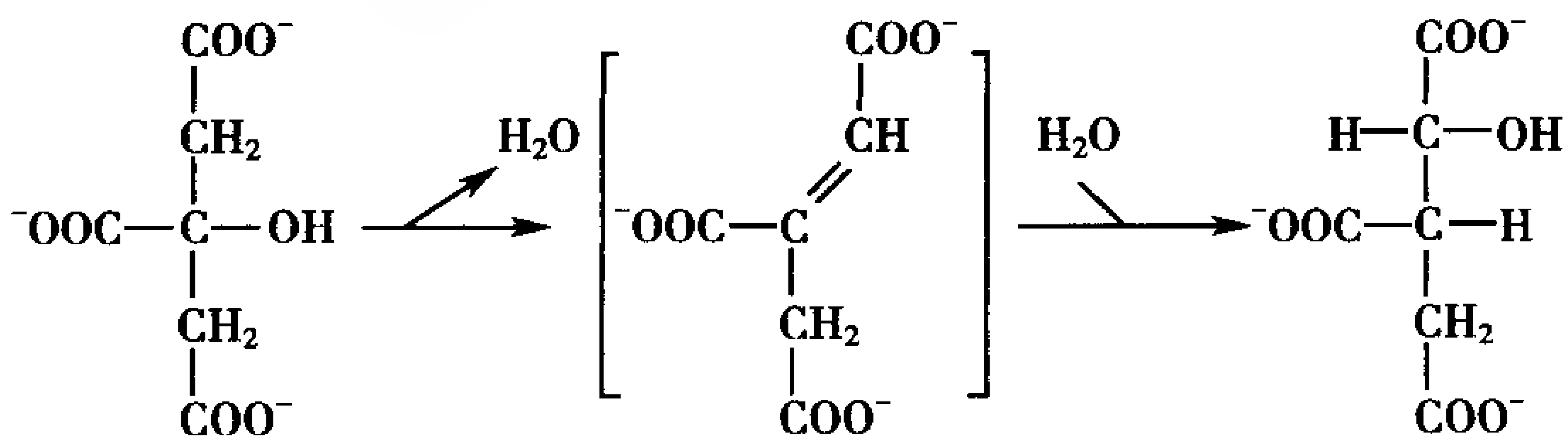
（一）TCA 循环由 8 步代谢反应组成

1. 乙酰 CoA 与草酰乙酸缩合成柠檬酸 1 分子乙酰 CoA 与 1 分子草酰乙酸缩合成柠檬酸。反应由柠檬酸合酶（citrate synthase）催化，缩合反应所需能量来自乙酰 CoA 的高能硫酯键。由于高能硫酯键水解时可释放出较多的自由能，$\Delta G^{\ominus\prime}$ 为 $-31.4kJ/mol$（$-7.5kcal/mol$），使反应成为单向、不可逆反应。而且柠檬酸合酶对草酰乙酸的 K_m 很低，所以即使线粒体内草酰乙酸的浓度很低，约 10mmol/L，反应也得以迅速进行。



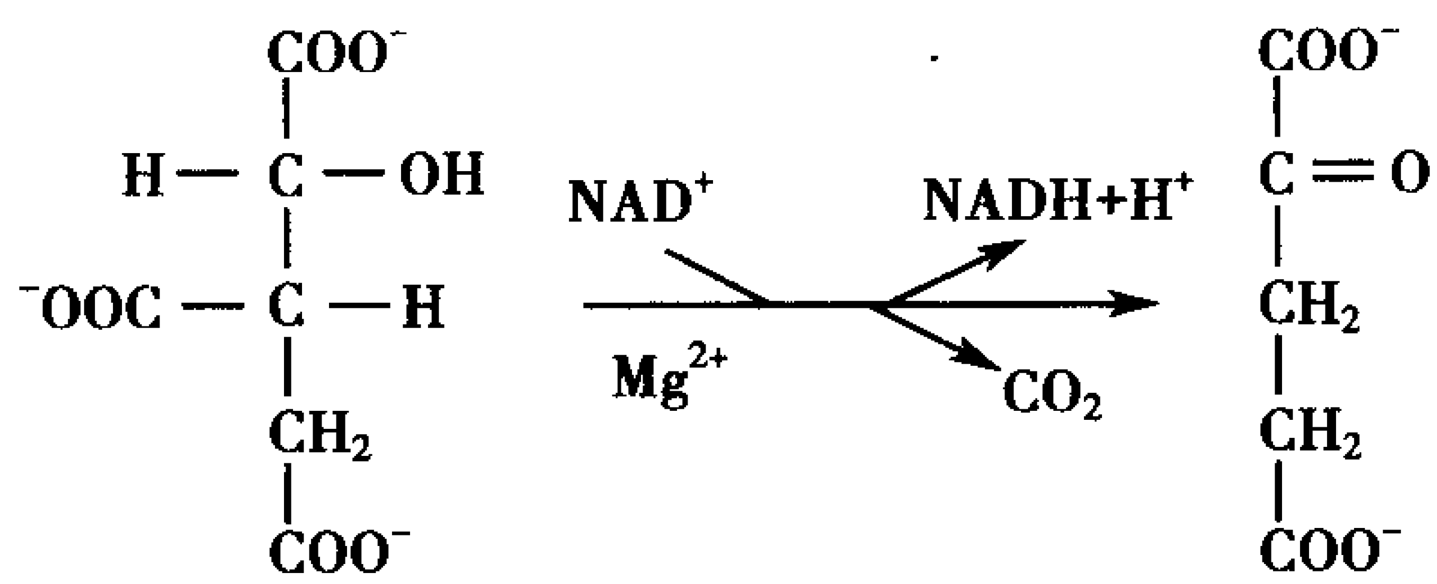
2. 柠檬酸经顺乌头酸转变为异柠檬酸 柠檬酸与异柠檬酸（isocitrate）的异构化可逆

互变反应由顺乌头酸酶催化。原来在 C_3 上的羟基转到 C_2 上，反应中的中间产物顺乌头酸仅与酶结合在一起以复合物的形式存在。



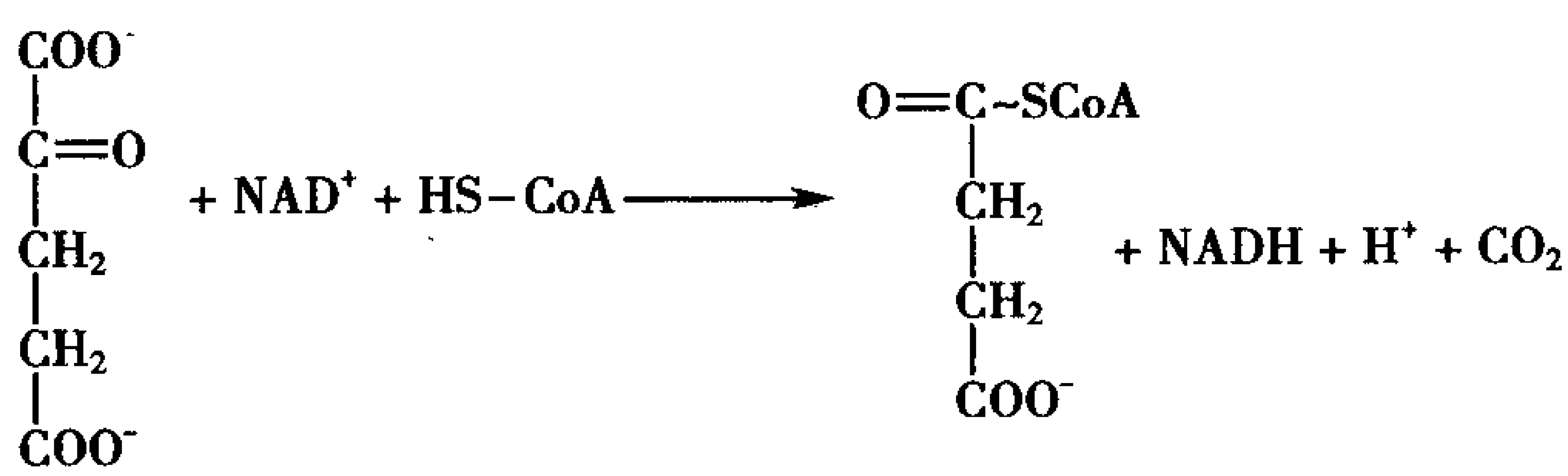
柠檬酸　　[酶-顺乌头酸]复合物　　异柠檬酸

3. 异柠檬酸氧化脱羧转变为 α-酮戊二酸　异柠檬酸在异柠檬酸脱氢酶（isocitrate dehydrogenase）催化下氧化脱羧产生 CO_2，其余碳链骨架部分转变为 α-酮戊二酸（α-ketoglutarate），脱下的氢由 NAD^+ 接受，生成 $NADH+H^+$。这是 TCA 循环反应中的第一次氧化脱羧，释出的 CO_2 可被视作乙酰 CoA 的 1 个碳原子氧化产物。



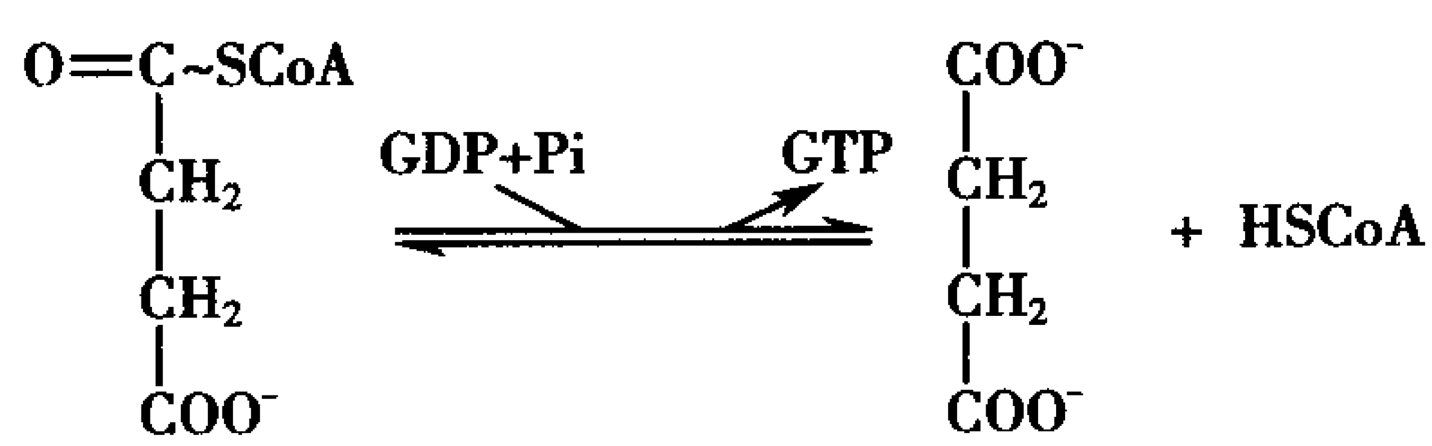
异柠檬酸　　α-酮戊二酸

4. α-酮戊二酸氧化脱羧生成琥珀酰 CoA　TCA 循环途径中发生的第二次氧化脱羧反应是 α-酮戊二酸氧化脱羧生成琥珀酰 CoA（succinyl CoA）。α-酮戊二酸氧化脱羧时释出的自由能较多，足以形成一高能硫酯键。这样，一部分能量就可以高能硫酯键形式储存在琥珀酰 CoA 内。催化 α-酮戊二酸氧化脱羧的酶是 α-酮戊二酸脱氢酶复合体（α-ketoglutarate dehydrogenase complex），其组成和催化反应过程与丙酮酸脱氢酶复合体类似，这就使得 α-酮戊二酸的脱羧、脱氢、形成高能硫酯键等反应可迅速完成。



α-酮戊二酸　　琥珀酰CoA

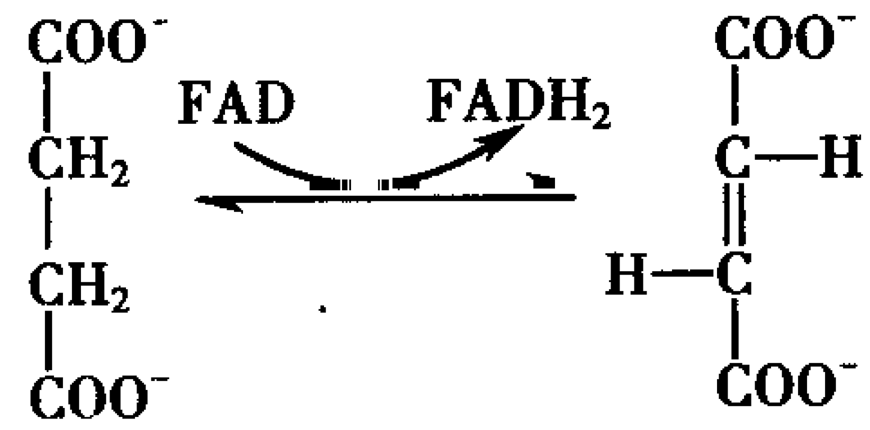
5. 琥珀酰 CoA 合成酶催化底物水平磷酸化反应　这步反应的产物是琥珀酸（succinic acid）。当琥珀酰 CoA 的高能硫酯键水解时，$\Delta G^{\ominus\prime}$ 约 $-33.4kJ/mol$（$-7.98kcal/mol$）。它可与 GDP 的磷酸化偶联，生成高能磷酸键。反应是可逆的，由琥珀酰 CoA 合成酶（succinyl CoA synthetase）催化。这是底物水平磷酸化的又一例子，是 TCA 循环中唯一直接生成高能磷酸键的反应。



琥珀酰CoA　　琥珀酸

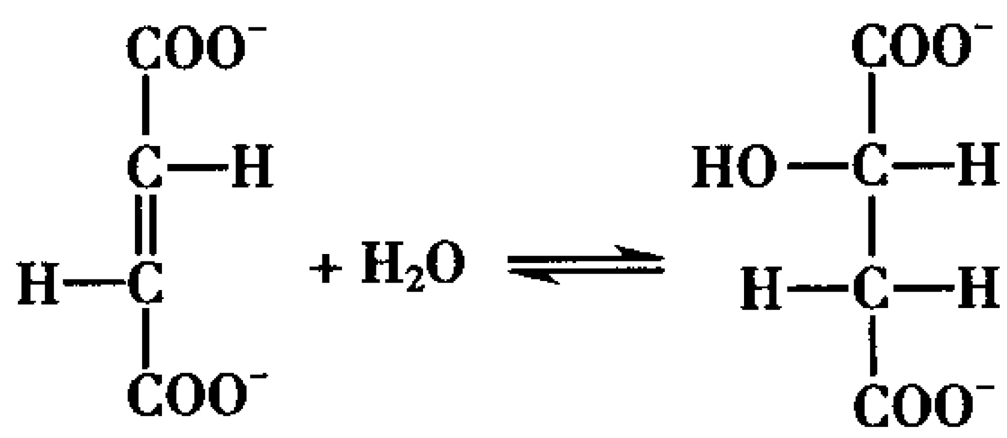
6. 琥珀酸脱氢生成延胡索酸　反应由琥珀酸脱氢酶（succinate dehydrogenase）催化。该

酶结合在线粒体内膜上，是 TCA 循环中唯一与内膜结合的酶。其辅酶是 FAD，还含有铁硫中心，来自琥珀酸的电子通过 FAD 和铁硫中心，经电子传递链被氧化，生成 1.5 分子 ATP。



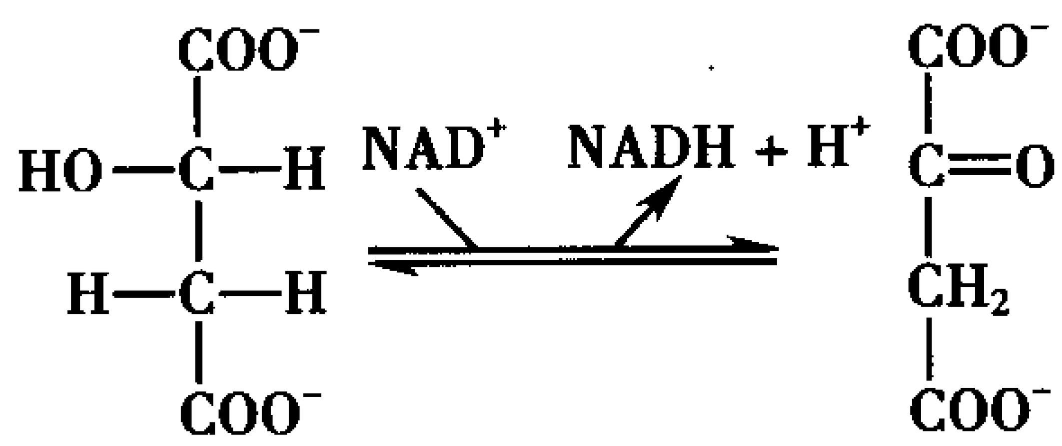
琥珀酸　　延胡索酸

7. 延胡索酸加水生成苹果酸　延胡索酸酶（fumarate hydratase）催化此可逆反应。



延胡索酸　　苹果酸

8. 苹果酸脱氢生成草酰乙酸　TCA 循环的最后反应由苹果酸脱氢酶（malate dehydrogenase）催化。苹果酸（malic acid）脱氢生成草酰乙酸，脱下的氢由 NAD^+ 接受，生成 $NADH+H^+$。在细胞内草酰乙酸不断地被用于柠檬酸合成，故这一可逆反应向生成草酰乙酸的方向进行。



苹果酸　　草酰乙酸

三羧酸循环的反应过程可归纳如图 4-5。

在 TCA 循环反应过程中，从 2 个碳原子的乙酰 CoA 与 4 个碳原子的草酰乙酸缩合成 6 个碳原子的柠檬酸开始，反复地脱氢氧化。羟基氧化成羧基后，通过脱羧方式生成 CO_2。二碳单位进入 TCA 循环后，生成 2 分子 CO_2，这是体内 CO_2 的主要来源。脱氢反应共有 4 次，其中 3 次脱氢（3 对氢或 6 个电子）由 NAD^+ 接受，1 次（一对氢或 2 个电子）由 FAD 接受。这些电子传递体将电子传给氧时才能生成 ATP。TCA 循环本身每循环一次只能以底物水平磷酸化生成 1 个 GTP。TCA 循环的总反应为：

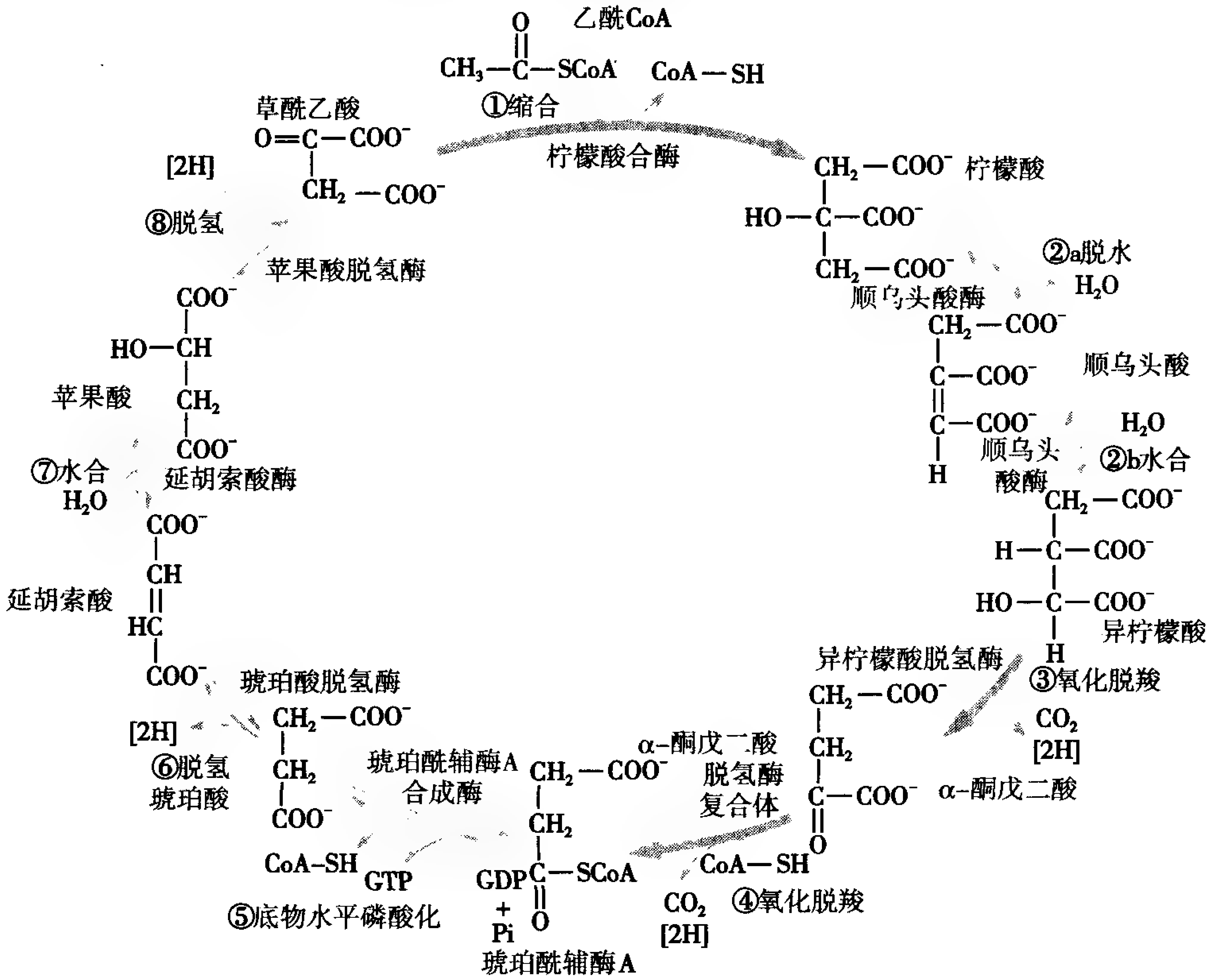
$$CH_3CO \sim SCoA + 3NAD^+ + FAD + GDP + Pi + 2H_2O \longrightarrow 2CO_2 + 3NADH + 3H^+ + FADH_2 + HS\text{-}CoA + GTP$$

在 TCA 循环中，从量上来说一个 2 碳化合物被氧化成 2 分子 CO_2。但用 ^{14}C 标记乙酰 CoA 进行的实验发现，CO_2 的碳原子来自草酰乙酸而不是乙酰 CoA。这是由于中间反应过程中 C 原子置换所致。但 TCA 循环运转一周的净结果仍是氧化了 1 分子乙酰 CoA。

另外，TCA 循环的中间产物包括草酰乙酸在内起着催化剂的作用，本身并无量的变化。不可能通过 TCA 循环从乙酰 CoA 合成草酰乙酸或 TCA 循环中的其他中间产物；同样，这些中间产物也不可能直接在 TCA 循环中被氧化成 CO_2 和 H_2O。TCA 循环中的草酰乙酸主要来自丙酮酸的直接羧化，也可通过苹果酸脱氢生成。无论何种来源，其最终来源是葡萄糖。

（二）TCA 循环受底物、产物和关键酶活性的调节

TCA 循环主要受其底物、产物和关键酶活性 3 种因素的调控。TCA 循环的速率和流



● 图 4-5 三羧酸循环

量主要受 3 种因素的调控：底物的供应量，催化循环最初几步反应酶的反馈别构抑制，产物堆积的抑制作用。

1. TCA 循环中有 3 个关键酶 在 TCA 循环中有 3 步不可逆反应：即由柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶催化的反应。乙酰 CoA 和草酰乙酸作为柠檬酸合酶的底物，其含量随细胞代谢状态而改变，从而影响柠檬酸合成的速率。同时，柠檬酸合酶活性可以决定乙酰 CoA 进入 TCA 循环的速率。异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶的催化产物有 NADH，其酶活性在 $NADH/NAD^+$，ATP/ADP 比值升高时被反馈抑制。ADP 还是异柠檬酸脱氢酶的变构激活剂。此外，产物的堆积抑制循环中的 3 个限速反应：琥珀酰 CoA 抑制 α-酮戊二酸脱氢酶的活性，还可抑制柠檬酸合酶的活性；柠檬酸抑制柠檬酸合酶的活性；终产物 ATP 则可抑制柠檬酸合酶和异柠檬酸脱氢酶的活性。ATP 对柠檬酸合酶的抑制作用可被 ADP 解除，ADP 是该酶的别构激活剂。

另外，当线粒体内 Ca^{2+} 浓度升高时，Ca^{2+} 不仅可直接与异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶结合，降低其对底物的 K_m 而使酶激活；也可激活丙酮酸脱氢酶复合体，从而推动 TCA 循环和有氧氧化的进行。

2. TCA 循环与上游和下游反应相协调 在正常情况下，糖酵解途径和 TCA 循环的速度是相协调的。在糖酵解途径中产生了多少丙酮酸，TCA 循环就正好需要多少丙酮酸来提供其作为底物的乙酰 CoA。这种协调不仅通过高浓度的 ATP、NADH 的抑制作用，亦通过柠檬酸对磷酸果糖激酶-1 的别构抑制作用而实现。氧化磷酸化的速率对 TCA 循环的运转也起着非常重要的作用。TCA 循环中有 4 次脱氢反应，从代谢物脱下的氢分别为 NAD^+ 及 FAD 接受。然后 H^+ 及 e 通过电子传递链进行氧化磷酸化。如不能有效进行氧化

磷酸化，$NADH+H^+$ 及 $FADH_2$ 仍保持还原状态，则 TCA 循环中的脱氢反应都将无法继续进行。

（三）TCA 循环在 3 大营养物质代谢中具有重要生理意义

1. TCA 循环是 3 大营养素的最终代谢通路 糖、脂肪、氨基酸在体内进行生物氧化都将产生乙酰 CoA，然后进入 TCA 循环进行降解。TCA 循环中只有一个底物水平磷酸化反应生成高能磷酸键。循环本身并不是释放能量、生成 ATP 的主要环节。其作用在于通过 4 次脱氢，为氧化磷酸化反应生成 ATP 提供还原当量。

2. TCA 循环是糖、脂肪、氨基酸代谢联系的枢纽 糖转变成脂肪是最重要的例子。在能量充足的条件下，从食物摄取的糖相当一部分转变成脂肪储存。葡萄糖分解成丙酮酸后进入线粒体内氧化脱羧生成乙酰 CoA，乙酰 CoA 必须再转移到胞液以合成脂酸。由于它不能通过线粒体膜，于是乙酰 CoA 先与草酰乙酸缩合成柠檬酸，再通过载体转运至胞质，在柠檬酸裂解酶（citrate lyase）作用下裂解成乙酰 CoA 及草酰乙酸，然后乙酰 CoA 即可合成脂酸。许多氨基酸的碳架是 TCA 循环的中间产物，通过草酰乙酸可转变为葡萄糖（参见糖异生一节）。反之，由葡萄糖提供的丙酮酸转变成的草酰乙酸及 TCA 循环中的其他二羧酸则可用于合成一些非必需氨基酸如天冬氨酸、谷氨酸等。此外，琥珀酰 CoA 可用以与甘氨酸合成血红素；乙酰 CoA 又是合成胆固醇的原料。因而，TCA 循环在提供生物合成的前体中起重要作用。

三、糖有氧氧化是机体获得 ATP 的主要方式

糖代谢过程中能量生成的发现

英国生理学家 A. V. Hill 和 O. Meyerhof 分别于 1912 年和 1922 年发现肌肉收缩过程中伴随着能量变化。1929 年，德国生物化学家 C. H. Fiske 和 K. Lohmann 等分别从肌肉中分离出三磷酸腺苷（ATP）。1935 年，K. Lohmann 测定出 ATP 的分子式。与此同时，他还发现不论在糖酵解或三羧酸循环等代谢过程中，都有伴随着 ATP 磷酸根的放出或 ADP 得到磷酸根的变化——化学能量高效率的传递方式。1941 年 F. A. 李普曼引入“高能磷酸键（～P）”的概念。1949 年美国生物化学家 E. P. Kennedy 和 A. L. Lehninger 报道了线粒体含有三羧酸循环所需要的全部酶系统，并且与磷酸化偶联，产生大量 ATP。

三羧酸循环中 4 次脱氢反应产生的 $NADH+H^+$ 和 $FADH_2$ 可传递给电子传递链产生 ATP。除三羧酸循环外，其他代谢途径中生成的 $NADH+H^+$ 或 $FADH_2$，也可经电子传递链传递生成 ATP。例如，糖酵解途径中 3-磷酸甘油醛脱氢成 3-磷酸甘油酸时生成的 $NADH+H^+$，在氧供应充足时就进入电子传递链而不再将丙酮酸还原成乳酸。$NADH+H^+$ 的氢传递给氧时，可生成 2.5 个 ATP；$FADH_2$ 的氢被氧化时只能生成 1.5 个 ATP。加上底物水平磷酸化生成的 1 个 ATP，一分子乙酰 CoA 经三羧酸循环彻底氧化分解共生成 10 个 ATP。若从丙酮酸脱氢开始计算，共产生 12.5 分子 ATP。1mol 的葡萄糖彻底氧化生成 CO_2 和 H_2O，可净生成 5 或 $7+2\times12.5=30$ 或 32mol ATP（见表 4-1）。

总的反应为：葡萄糖$+30ADP+30Pi+6O_2 \longrightarrow 30ATP+6CO_2+36H_2O$

表 4-1 葡萄糖有氧氧化生成的 ATP

	反 应	辅 酶	最终获得 ATP
第一阶段	葡萄糖→6-磷酸葡萄糖		−1
	6-磷酸果糖→1,6-二磷酸果糖		−1
	2×3-磷酸甘油醛→2×1,3-二磷酸甘油酸	2NADH（胞质）	3 或 5*
	2×1,3-二磷酸甘油酸→2×3-磷酸甘油酸		2
	2×磷酸烯醇式丙酮酸→2×丙酮酸		2
第二阶段	2×丙酮酸→2×乙酰 CoA	2NADH（线粒体基质）	5
第三阶段	2×异柠檬酸→2×α-酮戊二酸	2NADH（线粒体基质）	5
	2×α-酮戊二酸→2×琥珀酰 CoA	2NADH	5
	2×琥珀酰 CoA→2×琥珀酸		2
	2×琥珀酸→2×延胡索酸	$2FADH_2$	3
	2×苹果酸→2×草酰乙酸	2NADH	5
	由一个葡萄糖总共获得		30 或 32

* 获得 ATP 的数量取决于还原当量进入线粒体的穿梭机制

四、糖有氧氧化的调节是基于能量的需求

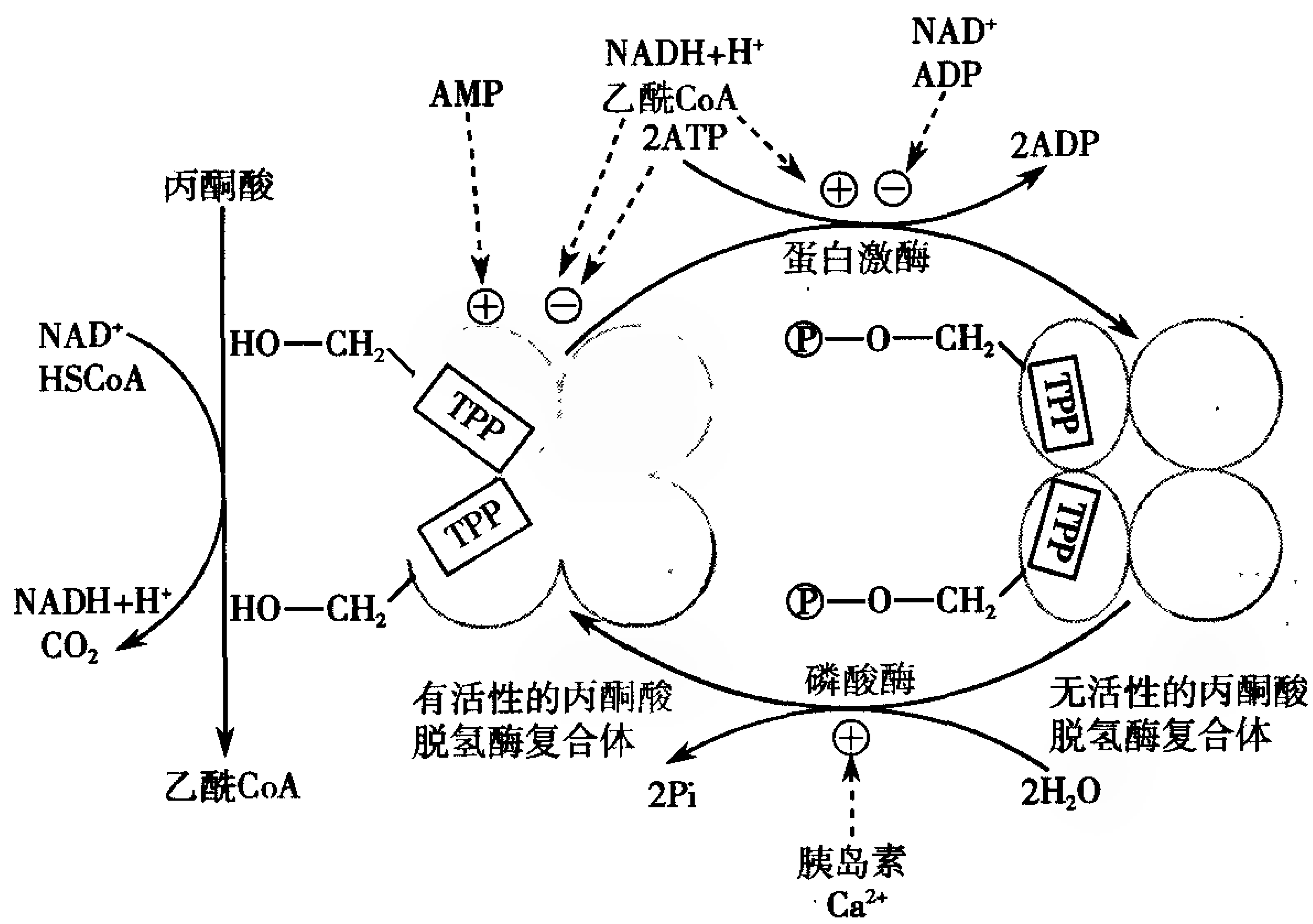
糖的有氧氧化是机体获得能量的主要方式。机体对能量的需求变动很大，因此有氧氧化的速率必须加以调节。有氧氧化的 3 个阶段中，糖酵解途径的调节前已叙述，这里主要叙述丙酮酸脱氢酶复合体的调节以及三羧酸循环的调节。

丙酮酸脱氢酶复合体可通过变构效应和共价修饰两种方式进行快速调节。丙酮酸脱氢酶复合体的反应产物乙酰 CoA 及 $NADH+H^+$ 对酶有反馈抑制作用，当乙酰 CoA/CoA 比例升高时，酶活性被抑制。$NADH/NAD^+$ 比例升高可能也有同样的作用。这两种情况见于饥饿、大量脂酸被动员利用时。所以这时糖的有氧氧化被抑制，大多数组织器官利用脂酸作为能量来源以确保脑等重要组织对葡萄糖的需要。ATP 对丙酮酸脱氢酶复合体有抑制作用，AMP 则能激活之。丙酮酸脱氢酶复合体可被丙酮酸脱氢酶激酶磷酸化。当其丝氨酸被磷酸化后，酶蛋白变构而失去活性。丙酮酸脱氢酶磷酸酶则使其去磷酸而恢复活性。乙酰 CoA 和 $NADH+H^+$ 除对酶有直接抑制作用外，还可间接通过增强丙酮酸脱氢酶激酶的活性而使其失活（图 4-6）。

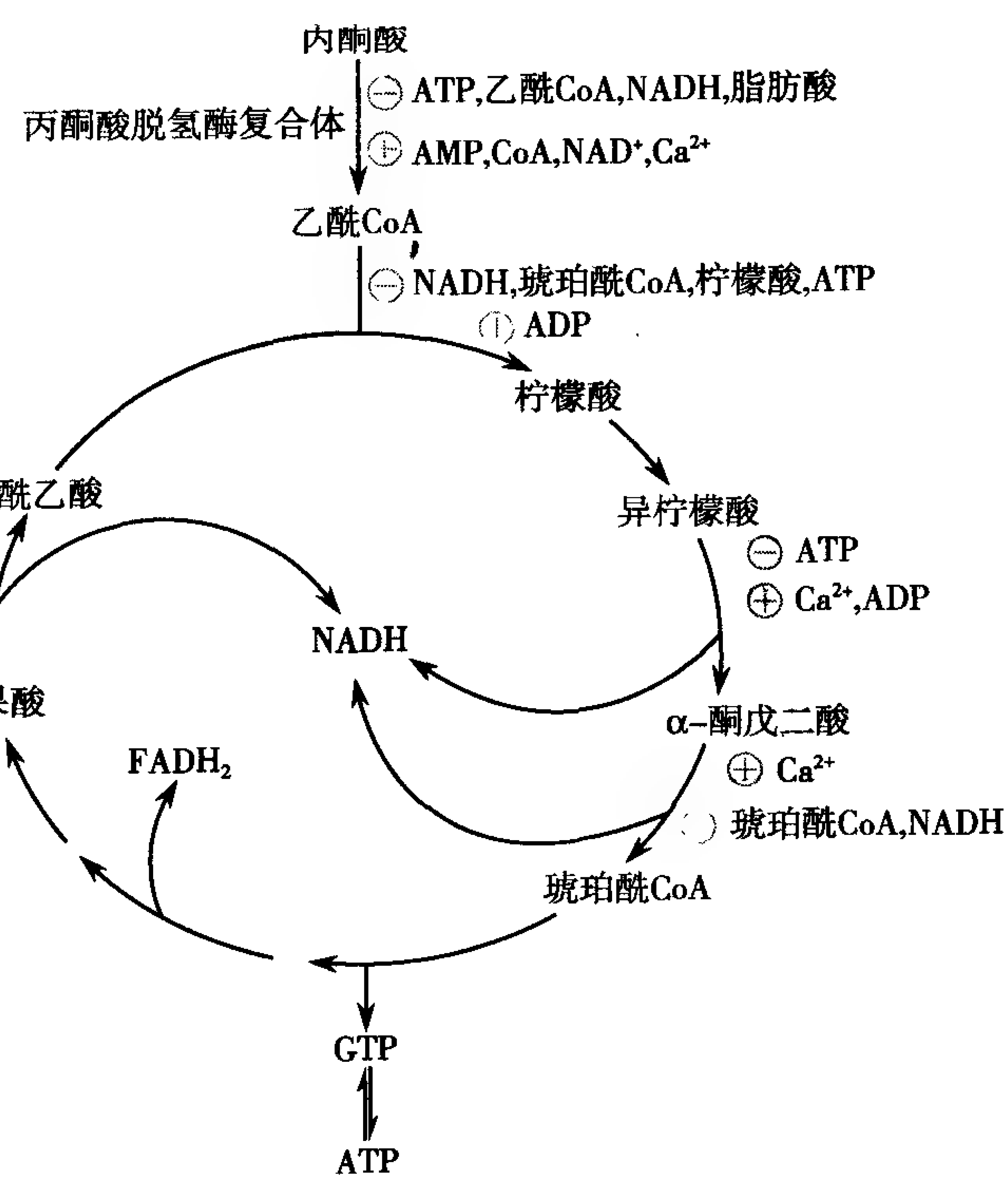
三羧酸循环的速率和流量受多种因素的调控。在三羧酸循环中有三个不可逆反应：柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶催化的反应。柠檬酸合酶活性可决定乙酰 CoA 进入三羧酸循环的速率，曾被认为是三羧酸循环主要的调节点。但是，柠檬酸可转移至胞液，分解成乙酰 CoA，用于合成脂酸，所以其活性升高并不一定加速三羧酸循环的运转。目前一般认为异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶才是三羧酸循环的调节点。异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶在 $NADH/NAD^+$，ATP/ADP 比率高时被反馈抑制。ADP 还是异柠檬酸脱氢酶的变构激活剂。

另外，当线粒体内 Ca^{2+} 浓度升高时，Ca^{2+} 不仅可直接与异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶结合，降低其对底物的 K_m 而使酶激活；也可激活丙酮酸脱氢酶复合体，从而推动三羧酸循环和有氧氧化的进行。

氧化磷酸化的速率对三羧酸循环的运转也起着非常重要的作用。三羧酸循环中有 4 次脱氢反应，从代谢物脱下的氢分别为 NAD^+ 及 FAD 接受。然后 H^+ 及 e 通过电子传递链进行氧化磷酸化。如不能有效进行氧化磷酸化，$NADH+H^+$ 及 $FADH_2$ 仍保持还原状态，则三羧酸循环中的脱氢反应都将无法继续进行。三羧酸循环的调节如图 4-7 所示。



● 图 4-6 丙酮酸脱氢酶复合体的调节



● 图 4-7 三羧酸循环的调控

有氧氧化的调节是为了适应机体或器官对能量的需要，有氧氧化全过程中许多酶的活性都受细胞内 ATP/ADP 或 ATP/AMP 比率的影响，因而能得以协调。当细胞消耗 ATP 以致 ATP 水平降低，ADP 和 AMP 浓度升高时，6-磷酸果糖激酶-1、丙酮酸激酶、丙酮酸脱氢酶复合体以及三羧酸循环中的异柠檬酸脱氢酶、α-酮戊二酸脱氢酶复合体以及氧化磷酸化等均被激活，从而加速有氧氧化，补充 ATP。反之，当细胞内 ATP 含量丰富时，上述酶的活性均降低，氧化磷酸化亦减弱。细胞内 ATP 的浓度约为 AMP 的 50 倍。ATP

被利用生成 ADP 后，可再通过腺苷酸激酶反应而生成 AMP：2ADP→ATP＋AMP。由于 AMP 的浓度很低，所以每生成 1 分子 AMP，其浓度的变动比 ATP 的变动大得多。这样信号得以放大，从而发挥有效的调节作用。

五、巴斯德效应是指糖有氧氧化抑制糖酵解的现象

法国科学家巴斯德（Pasteur）发现酵母菌在无氧时进行生醇发酵。将其转移至有氧环境，生醇发酵即被抑制，有氧氧化抑制生醇发酵（或糖酵解）的现象称为巴斯德效应。肌组织也有这种情况。缺氧时，丙酮酸不能进入三羧酸循环，而在胞质中转变成乳酸。通过糖酵解消耗的葡萄糖为有氧时的 7 倍。关于丙酮酸的代谢去向，由 NADH＋H^+去路决定。有氧时 NADH＋H^+可进入线粒体内氧化，丙酮酸就进行有氧氧化而不生成乳酸。缺氧时 NADH＋H^+不能被氧化，丙酮酸就作为氢接受体而生成乳酸。所以有氧抑制了酵解。缺氧时通过糖酵解途径分解的葡萄糖增加是由于缺氧时氧化磷酸化受阻，ADP 与 Pi 不能合成 ATP，ADP/ATP 比例升高，反映在胞液内，则是 6-磷酸果糖激酶-1 及丙酮酸激酶活性增强的结果。

第四节　葡萄糖的其他代谢途径

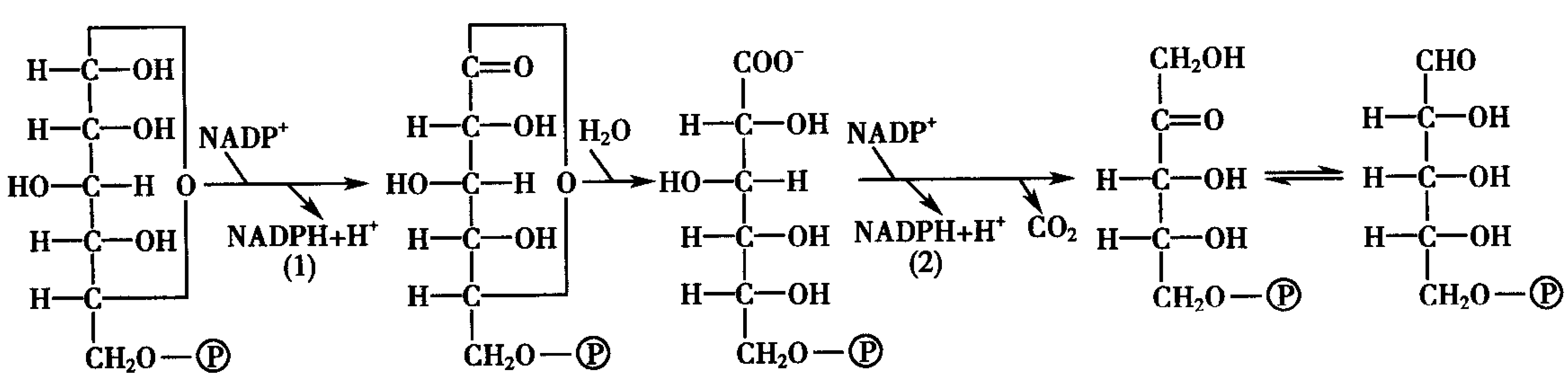
一、磷酸戊糖途径生成 NADPH 和磷酸戊糖

细胞内的葡萄糖通过有氧氧化分解，生成大量 ATP，这是葡萄糖分解代谢的主要途径。此外尚存在其他代谢途径，如磷酸戊糖途径（pentose phosphate pathway）就是另一重要途径。葡萄糖经此途径代谢的主要意义是产生磷酸核糖、NADPH 和 CO_2，而不是生成 ATP。

（一）磷酸戊糖途径的反应过程分为两个阶段

磷酸戊糖途径的代谢反应在胞质中进行，其过程可分为二个阶段：第一阶段是氧化反应，生成磷酸戊糖、NADPH 及 CO_2。第二阶段则是非氧化反应，包括一系列基团转移。

1. 6-磷酸葡萄糖在氧化阶段生成磷酸戊糖和 NADPH



6-磷酸葡萄糖　6-磷酸葡萄糖酸内酯　6-磷酸葡萄糖酸　5-磷酸核酮糖　5-磷酸核糖

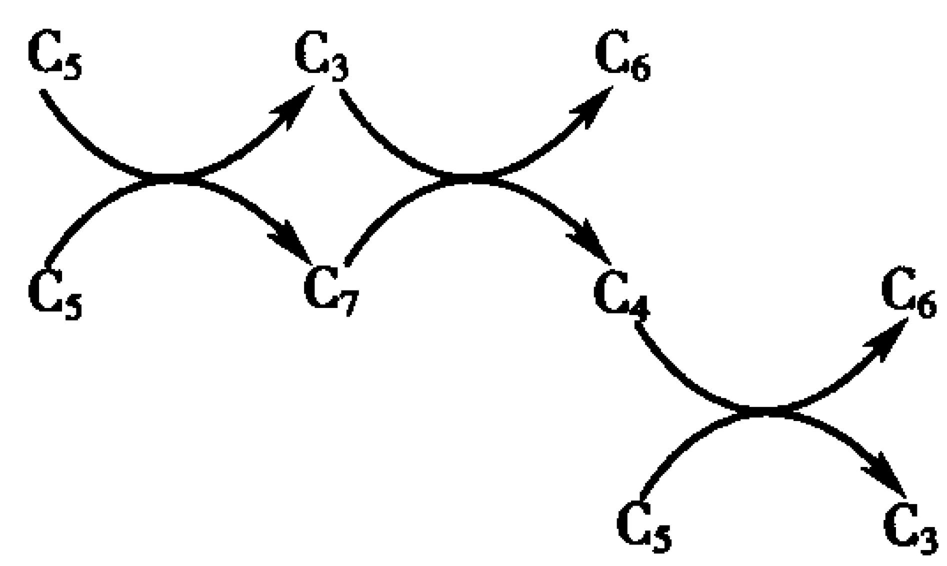
首先，6-磷酸葡萄糖由 6-磷酸葡萄糖脱氢酶催化脱氢生成 6-磷酸葡萄糖酸内酯，在此反应中 $NADP^+$为电子受体，平衡趋向于生成 NADPH，需要 Mg^{2+}参与；6-磷酸葡萄糖酸内酯在内酯酶（lactonase）的作用下水解为 6-磷酸葡萄糖酸，后者在 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶作用下再次脱氢并自发脱羧而转变为 5-磷酸核酮糖，同时生成 NADPH 及 CO_2。5-磷酸核酮糖在异构酶作用下，即转变为 5-磷酸核糖；或者在差向异构酶作用下，转变为 5-磷酸木酮糖。在第一阶段，1 分子 6-磷酸葡萄糖生成 5-磷酸核糖的过程中，同时生成 2 分子

NADPH 及 1 分子 CO_2。

2. 经过基团转移反应进入糖酵解途径

在第一阶段中共生成 1 分子磷酸戊糖和 2 分子 NADPH。前者用于合成核苷酸，后者用于许多化合物的合成代谢。但细胞中合成代谢消耗的 NADPH 远比核糖需要量大，因此，葡萄糖经此途径生成多余的核糖。第二阶段反应的意义就在于通过一系列基团转移反应，将核糖转变成 6-磷酸果糖和 3-磷酸甘油醛而进入糖酵解途径。因此磷酸戊糖途径也称磷酸戊糖旁路（pentose phosphate shunt）。

反应可概括为：3 分子磷酸戊糖转变成 2 分子磷酸己糖和 1 分子磷酸丙糖。这些基团转移反应可分为两类。一类是转酮醇酶（transketolase）反应，转移含 1 个酮基、1 个醇基的 2 碳基团，反应需 TPP 作为辅酶并需 Mg^{2+} 参与；另一类是转醛醇酶（transaldolase）反应，转移 3 碳单位。接受体都是醛糖。

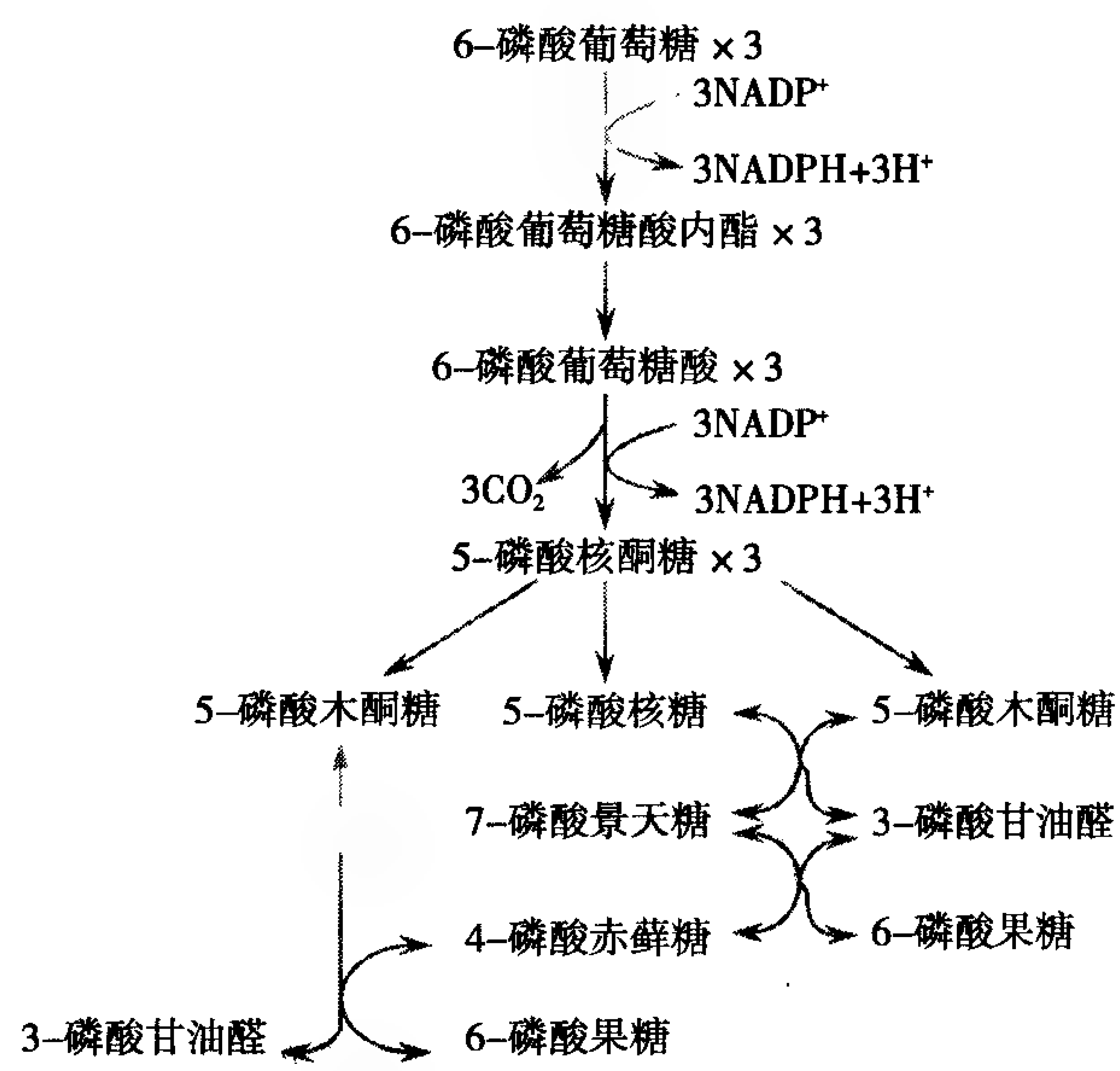


磷酸戊糖之间的互相转变由相应的异构酶、差向异构酶催化，这些反应均为可逆反应。

磷酸戊糖途径的反应可归纳于图 4-8。

磷酸戊糖途径总的反应为：

3×6-磷酸葡萄糖＋6$NADP^+$→2×6-磷酸果糖＋3-磷酸甘油醛＋6NADPH＋6H^+＋3CO_2



● 图 4-8 磷酸戊糖途径

（二）磷酸戊糖途径主要受 NADPH/$NADP^+$ 比值的调节

6-磷酸葡萄糖可进入多条代谢途径。6-磷酸葡萄糖脱氢酶是磷酸戊糖途径的限速酶，其活性决定 6-磷酸葡萄糖进入此途径的流量。早就发现摄取高碳水化合物饮食，尤其在饥饿后重饲时，肝内此酶含量明显增加，以适应脂酸合成时对 NADPH＋H^+ 的需要。至于其活性的快速调节，主要受 NADPH/$NADP^+$ 比例的影响。比例升高，磷酸戊糖途径被抑制；比例降低时被激活。NADPH 对该酶有强烈的抑制作用。因此，磷酸戊糖途径的流量取决于 NADPH 的需求。

（三）磷酸戊糖途径的生理意义在于生成 NADPH 和 5-磷酸核糖

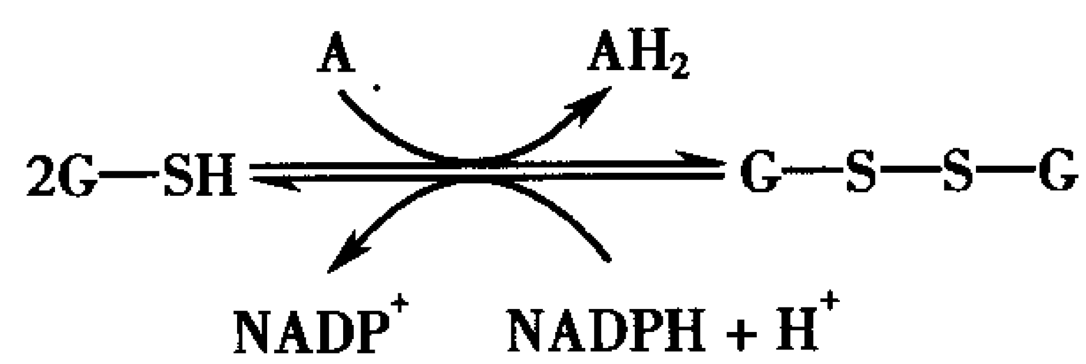
1. 为核酸的生物合成提供核糖 核糖是核酸和游离核苷酸的组成成分。体内的核糖并不依赖从食物摄入，而是通过磷酸戊糖途径生成。葡萄糖既可经 6-磷酸葡萄糖脱氢、脱羧的氧化反应产生磷酸核糖，也可通过糖酵解途径的中间产物 3-磷酸甘油醛和 6-磷酸果糖经过前述的基团转移反应而生成磷酸核糖。这两种方式的相对重要性因物种而异。人类主要通过氧化反应生成核糖。肌组织内缺乏 6-磷酸葡萄糖脱氢酶，磷酸核糖靠基团转移反应生成。

2. 提供 NADPH 作为供氢体参与多种代谢反应　NADPH 与 NADH 不同，它携带的氢不是通过电子传递链氧化释出能量，而是参与许多代谢反应，发挥不同的功能。

（1）NADPH 是体内许多合成代谢的供氢体　如从乙酰 CoA 合成脂酸、胆固醇；又如机体合成非必需氨基酸时，先由 α-酮戊二酸与 NADPH 及 NH_3 生成谷氨酸；谷氨酸可与其他 α-酮酸进行转氨基反应而生成相应的氨基酸。

（2）NADPH 参与体内羟化反应　有些羟化反应与生物合成有关。例如：从鲨烯合成胆固醇，从胆固醇合成胆汁酸、类固醇激素等。有些羟化反应则与生物转化（biotransformation）有关（详见第十七章）。

（3）NADPH 还用于维持谷胱甘肽（glutathione，GSH）的还原状态　谷胱甘肽是一个三肽，2 分子 GSH 可以脱氢氧化成为氧化型谷胱甘肽 GSSG，而后者可在谷胱甘肽还原酶作用下，被 NADPH 重新还原成为还原型谷胱甘肽：



还原型谷胱甘肽是体内重要的抗氧化剂，可以保护一些含—SH 基的蛋白质或酶免受氧化剂尤其是过氧化物的损害。在红细胞中还原型谷胱甘肽具有更重要的作用。它可以保护红细胞膜蛋白的完整性。有些人群（我国南方）的红细胞内缺乏 6-磷酸葡萄糖脱氢酶，不能经磷酸戊糖途径得到充足的 NADPH，则难使谷胱甘肽保持还原状态，此时红细胞尤其是较老的红细胞易于破裂，发生溶血性黄疸。他们常因食用蚕豆而诱发，故称为蚕豆病。

二、糖醛酸途径可生成葡萄糖醛酸

糖醛酸途径（glucuronate pathway）在葡萄糖代谢中仅占很小一部分。从 6-磷酸葡萄糖开始先转变为尿苷二磷酸葡萄糖（uridine diphosphate glucose，UDPG），过程见糖原合成。然后 UDPG 在 UDPG 脱氢酶催化下氧化成为尿苷二磷酸葡萄糖醛酸（uridine diphosphate glucuronic acid，UDPGA）。葡萄糖经糖醛酸途径转变为 5-磷酸木酮糖后即与磷酸戊糖途径衔接（图 4-9）。

对人类而言，糖醛酸途径的主要生理意义在于生成活化的葡萄糖醛酸，即 UDPGA。葡萄糖醛酸是组成蛋白聚糖的糖胺聚糖，如透明质酸、硫酸软骨素、肝素等的组成成分（见第十九章）。

葡萄糖醛酸在生物转化过程中参与很多结合反应（第十七章）。

6-磷酸葡萄糖
↓
1-磷酸葡萄糖
↓
UDPG
↓
UDPGA
↓
1-磷酸葡萄糖醛酸
↓
葡萄糖醛酸
↓
L-古洛糖酸
↓
L-木酮糖
↓
木糖醇
↓
D-木酮糖
↓
5-磷酸木酮糖
↓
磷酸戊糖途径

● 图 4-9　糖醛酸途径

三、多元醇途径可生成木糖醇、山梨醇等

葡萄糖代谢过程中可生成一些多元醇，如木糖醇（xylitol）、山梨醇（sorbitol）等，所以被称为多元醇途径（polyol pathway）。如葡萄糖经醛糖还原酶作用，NADPH＋H^+ 供氢，生成山梨醇。但这些代谢过程局限于某些组织，对整个葡萄糖代谢所占比重极少，无重要性。所以严格说来不能称为代谢途径。

在糖醛酸途径中 L-木酮糖转变为 D-木酮糖时，中间生成木糖醇，分别由 2 种不同的木糖醇脱氢酶催化。

肝、脑、肾上腺、眼的晶状体等含有的醛糖还原酶可将醛糖还原成

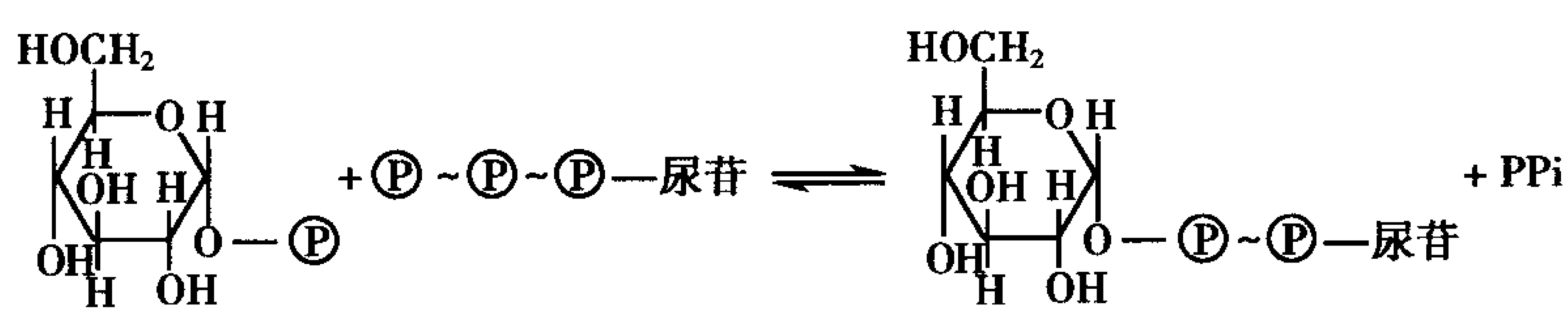
相应的多元醇。这些多元醇本身并无毒性，但其不易通过细胞膜。1 型糖尿病患者血糖水平高，透入晶状体的葡萄糖增加以致生成较多的山梨醇。山梨醇在局部增多可使渗透压升高而引起白内障。

第五节 糖原的合成与分解

糖原(glycogen)是动物体内糖的储存形式。摄入的糖类大部分转变成脂肪(甘油三酯)后储存于脂肪组织内,只有一小部分以糖原形式储存。糖原作为葡萄糖储备的生物学意义在于,当机体需要葡萄糖时它可以迅速被动用以供急需;而脂肪则不能。肝和肌是储存糖原的主要组织器官,但肝糖原和肌糖原的生理意义有很大不同。肌糖原主要供肌收缩的急需;肝糖原则是血糖的重要来源。这对于一些依赖葡萄糖作为能量来源的组织,如脑、红细胞等尤为重要。因此,下面主要以肝糖原为例介绍糖原合成与分解的途径、调节和生理意义。

一、糖原的合成代谢主要在肝和肌组织中进行

葡萄糖先在葡萄糖激酶作用下磷酸化成为 6-磷酸葡萄糖，后者再转变成 1-磷酸葡萄糖。这是为葡萄糖与糖原分子的连接作准备。1 磷酸葡萄糖与尿苷三磷酸（UTP）反应生成尿苷二磷酸葡萄糖及焦磷酸：

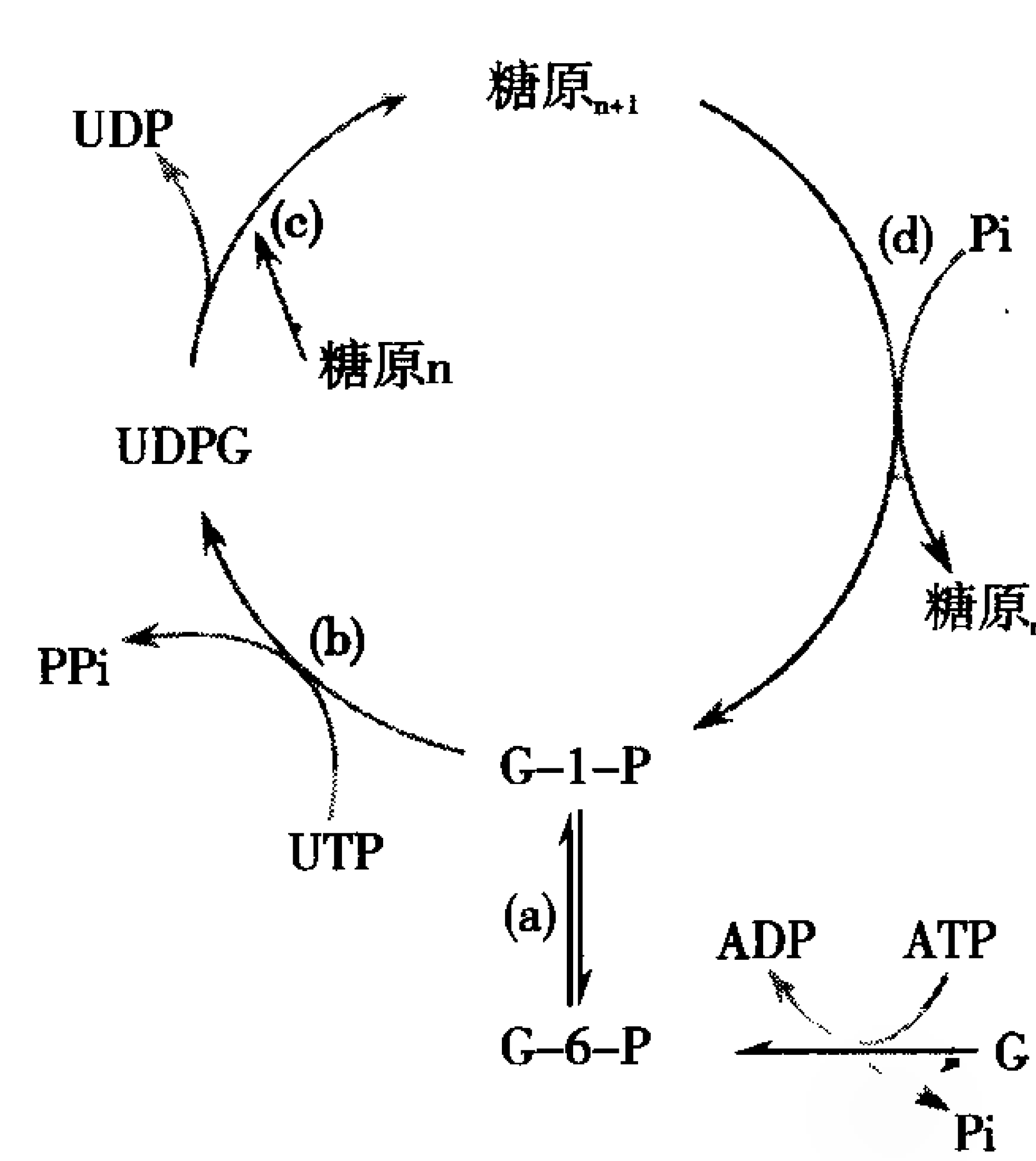


1-磷酸葡萄糖　　　UDPG

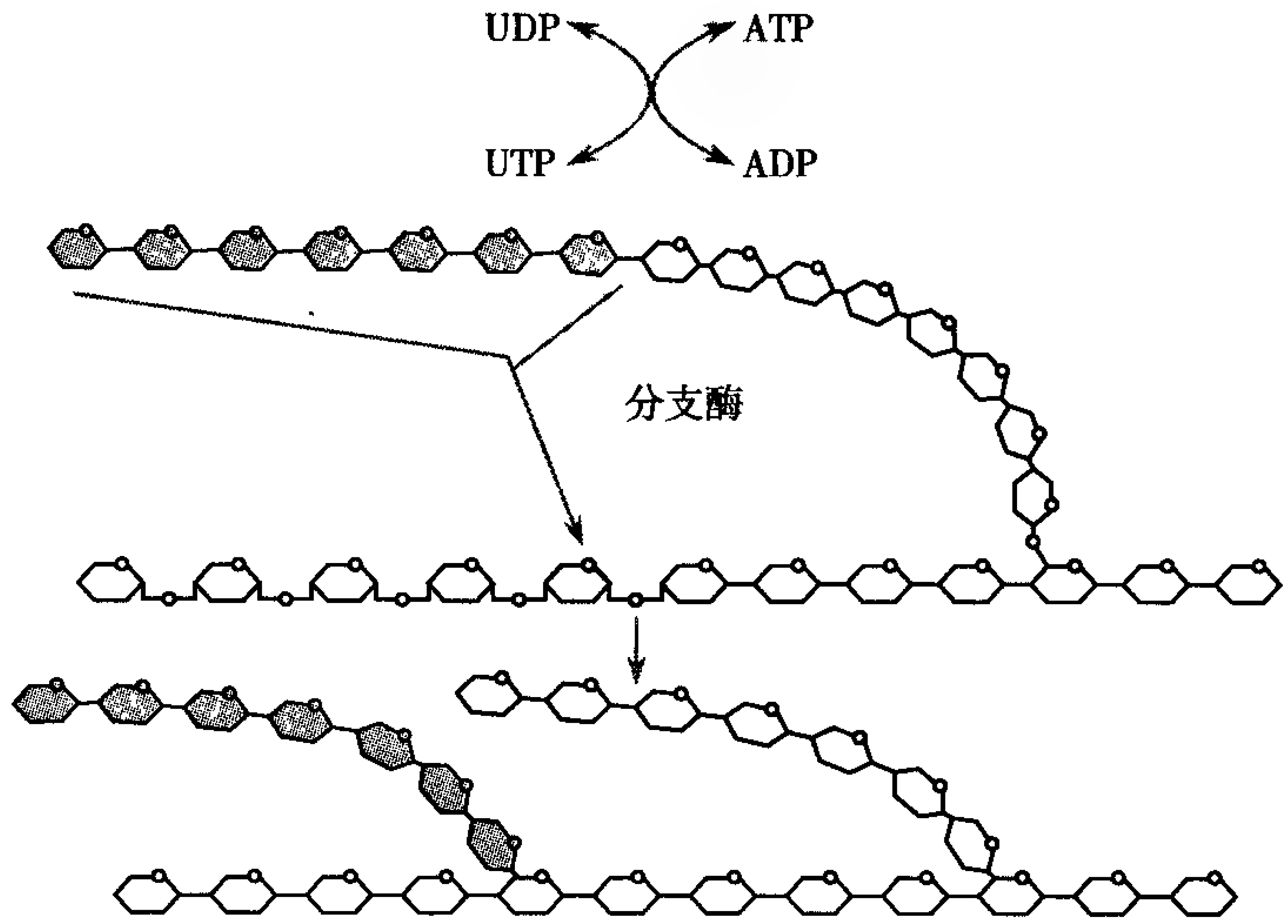
反应是可逆的,由 UDPG 焦磷酸化酶(UDPG pyrophosphorylase)催化。由于焦磷酸在体内迅速被焦磷酸酶水解,使反应向合成糖原方向进行。体内有许多合成代谢反应是由焦磷酸水解而推动的。UDPG 可看作"活性葡萄糖",在体内充作葡萄糖供体。最后在糖原合酶(glycogen synthase)作用下,UDPG 的葡萄糖基转移给糖原引物的糖链末端,形成 α-1,4 糖苷键。所谓糖原引物是指原有的细胞内的较小的糖原分子。游离葡萄糖不能作为 UDPG 的葡萄糖基的接受体。上述反应反复进行,可使糖链不断延长。糖原合成及分解途径可归纳于图 4-10。

在糖原合酶的作用下，糖链只能延长，不能形成分支。当糖链长度达到 12～18 个葡萄糖基时，分支酶（branching enzyme）将一段糖链，约 6～7 个葡萄糖基转移到邻近的糖链上，以 α-1，6-糖苷键相接，从而形成分支（图 4-11）。分支的形成不仅可增加糖原的水溶性，更重要的是可增加非还原端数目，以便磷酸化酶能迅速分解糖原。

从葡萄糖合成糖原是耗能的过程。葡萄糖磷酸化时消耗 1 个 ATP，焦磷酸水解成 2 分子磷酸时又损失 1 个高能磷酸键，共消耗 2 个 ATP。糖原合酶反应中生成的 UDP 必须利用 ATP 重新生成 UTP，即 ATP 中的高能磷酸键转移给了 UTP，因此反应虽消耗 1 个 ATP，但无高能磷酸键的损失。



●图 4-10 糖原的合成与分解
(a) 磷酸葡萄糖变位酶；(b) UDPG 焦磷酸化酶；(c) 糖原合酶；(d) 磷酸化酶



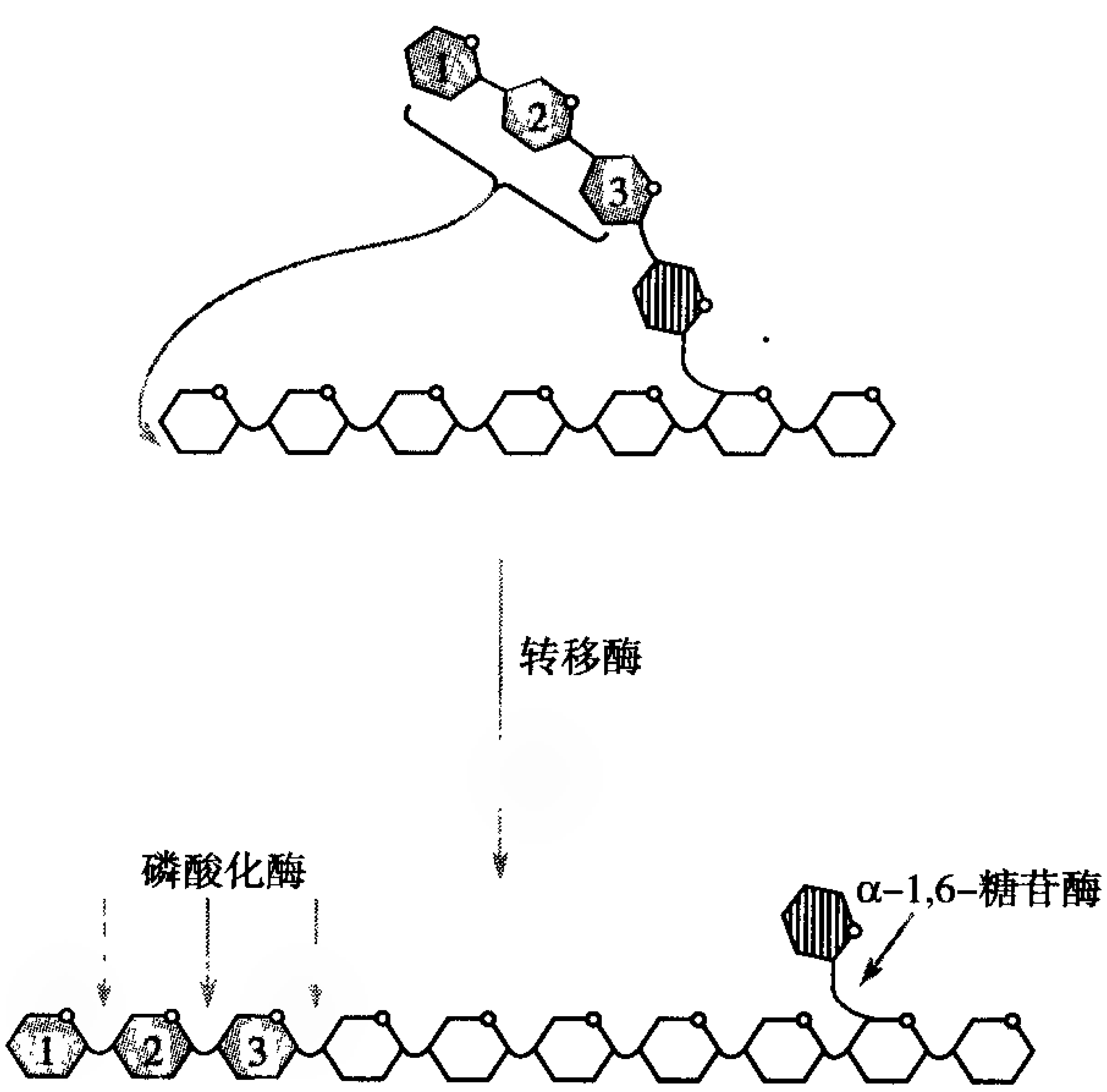
●图 4-11　分支酶的作用

在糖原合成过程中作为引物的第一个糖原分子从何而来，过去一直不太清楚。近来人们在糖原分子的核心发现了一种名为 glycogenin 的蛋白质。Glycogenin 可对其自身进行共价修饰，将 UDP-葡萄糖分子的 C_1 结合到 glycogenin 分子的酪氨酸残基上，从而使它糖基化。这个结合上去的葡萄糖分子即成为糖原合成时的引物。

二、肝糖原分解产物——葡萄糖可补充血糖

糖原分解（glycogenolysis）习惯上是指肝糖原分解成为葡萄糖。由肝糖原分解而来的 6-磷酸葡萄糖，除了水解成葡萄糖而释出之外，也可循糖酵解途径或磷酸戊糖途径等进行代谢。但当机体需要补充血糖，如饥饿时，后两条代谢途径均被抑制，肝糖原则绝大部分分解成葡萄糖释放入血。

肝糖原分解的第一步是从糖链的非还原端开始的，在糖原磷酸化酶（glycogen phosphorylase）作用下分解下一个葡萄糖基，生成 1-磷酸葡萄糖，磷酸化酶只能分解 α-1,4-糖苷键，对 α-1,6-糖苷键无作用。由于是磷酸解生成 1-磷酸葡萄糖而不是水解成游离葡萄糖，自由能变动较小，反应是可逆的。但是在细胞内由于无机磷酸盐的浓度约为 1-磷酸葡萄糖的 100 倍，所以实际上反应只能向糖原分解方向进行。当糖链上的葡萄糖基逐个磷酸解至距分支点约 4 个葡萄糖基时，由于空间位阻，磷酸化酶不能再发挥作用。这时由葡聚糖转移酶将 3 个葡萄糖基转移到邻近糖链的末端，仍以 α-1,4-糖苷键连接。剩下 1 个以 α-1,6-糖苷键与糖链形成分支的葡萄糖基被 α-1,6-葡萄糖苷酶水解成游离葡萄糖。除去分支后，磷酸化酶即可继续发挥作用。目前认为葡聚糖转移酶和 α-1,6-葡萄糖苷酶是同一酶的两种活性，合称脱支酶（debranching enzyme）(图 4-



●图 4-12　脱支酶的作用

12）。在几个酶的共同作用下，最终产物中约 85%为 1-磷酸葡萄糖，15%为游离葡萄糖。1-磷酸葡萄糖转变为 6-磷酸葡萄糖后，由葡萄糖-6-磷酸酶（glucose-6-phosphatase）水解成葡萄糖释放入血。葡萄糖-6-磷酸酶只存在于肝、肾中，而不存在于肌中。所以只有肝和肾可补充血糖；而肌糖原不能分解成葡萄糖，只能进行糖酵解或有氧氧化。

三、糖原的合成与分解受到彼此相反的调节

糖原的合成与分解不是简单的可逆反应，而是分别通过两条不同途径进行的，这样才能进行精细的调节。当糖原合成途径活跃时，分解途径则被抑制，才能有效地合成糖原；反之亦然。这种合成与分解循两条不同途径进行的现象，是生物体内的普遍规律。

糖原合成途径中的糖原合酶和糖原分解途径中的磷酸化酶都是催化不可逆反应的关键酶。这两种酶分别是两条代谢途径的调节酶，其活性决定不同途径的代谢速率，从而影响糖原代谢的方向。糖原合酶和磷酸化酶的快速调节有共价修饰和变构调节两种方式。

（一）糖原磷酸化酶是糖原分解的关键酶

肝糖原磷酸化酶有磷酸化和去磷酸化两种形式。当该酶 14 位丝氨酸被磷酸化时，活性很低的磷酸化酶（称为磷酸化酶 b）就转变为活性强的磷酸型磷酸化酶（称为磷酸化酶 a）。这种磷酸化过程由磷酸化酶 b 激酶催化。磷酸化酶 b 激酶也有两种形式。去磷酸的磷酸化酶 b 激酶没有活性。在依赖 cAMP 的蛋白激酶作用下转变为磷酸型具有活性的磷酸化酶 b 激酶。其去磷酸则由磷蛋白磷酸酶-1 催化。

依赖 cAMP 的蛋白激酶（cAMP-dependent protein kinase，PKA）也有活性及无活性两种形式，其活性受 cAMP 调节。ATP 在腺苷酸环化酶作用下生成 cAMP，而腺苷酸环化酶的活性受激素调节。cAMP 在体内很快被磷酸二酯酶水解成 AMP，蛋白激酶随即转变为无活性型。这种通过一系列酶促反应将激素信号放大的连锁反应称为级联放大系统（cascade system），与酶含量调节相比（一般以几小时或天计），反应快，效率高。其意义有二：一是放大效应；二是级联中各级反应都存在有可被调节的方式。

此外，磷酸化酶还受变构调节，葡萄糖是其变构调节剂。当血糖升高时，葡萄糖进入肝细胞，与磷酸化酶 a 的变构调节部位结合，引起构象改变，暴露出磷酸化的第 14 位丝氨酸，然后在磷蛋白磷酸酶-1 催化下去磷酸化而失活。因此，当血糖浓度升高时，可降低肝糖原的分解。这种调节方式速度更快，仅需几毫秒。

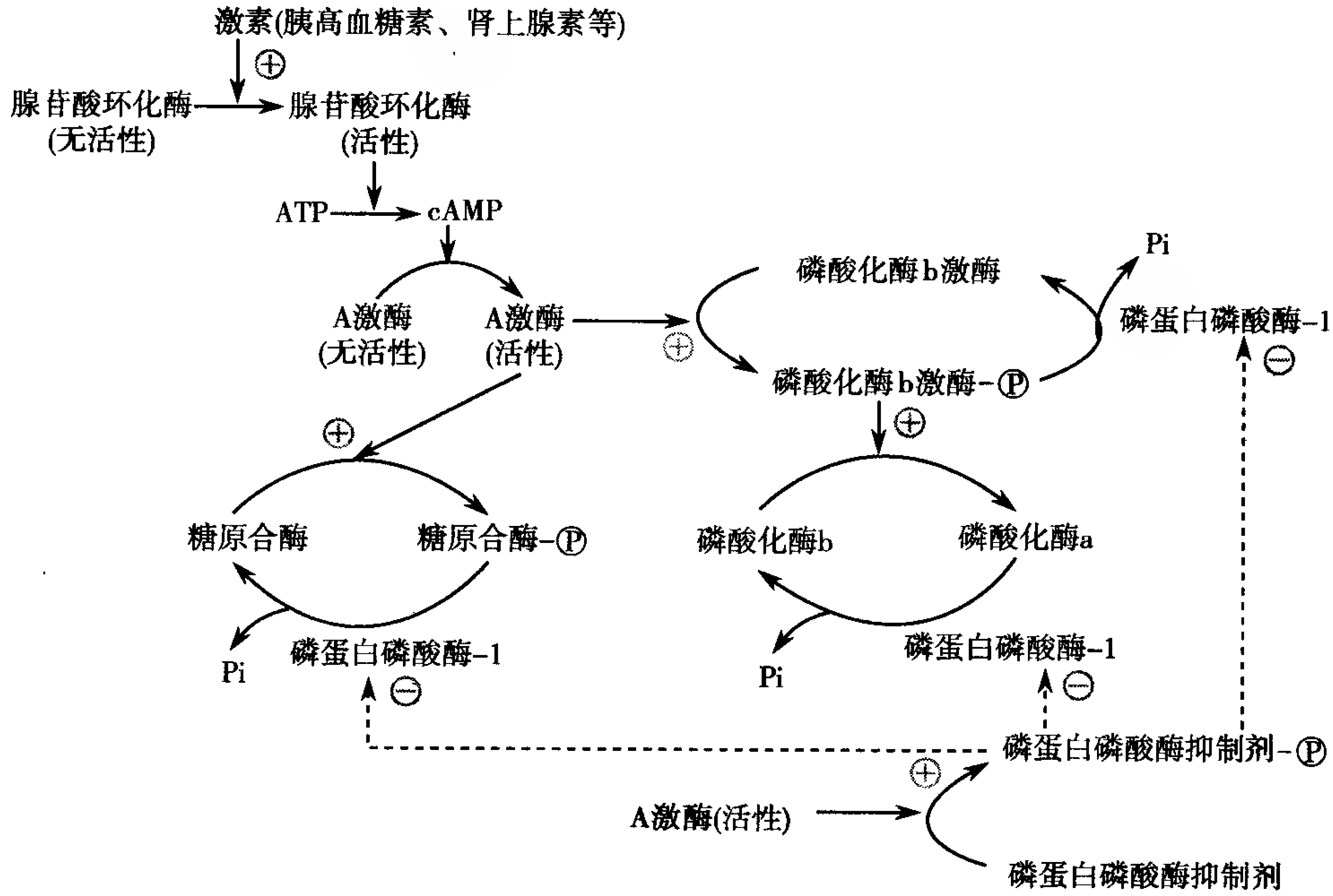
（二）糖原合酶是糖原合成的关键酶

糖原合酶亦分为 a、b 两种形式。糖原合酶 a 有活性，磷酸化成糖原合酶 b 后即失去活性。催化其磷酸化的也是依赖 cAMP 的蛋白激酶，可磷酸化其多个丝氨酸残基。此外，磷酸化酶 b 激酶也可磷酸化其中 1 个丝氨酸残基，使糖原合酶失活。

综上所述，磷酸化酶和糖原合酶的活性受磷酸化和去磷酸化的共价修饰。两种酶磷酸化和去磷酸化的方式相似，但效果不同，磷酸化酶去磷酸化后活性降低，而糖原合酶的去磷酸化形式则是有活性的。这种精细的调控，避免了由于分解、合成两个途径同时进行所造成的 ATP 的浪费。

使磷酸化酶 a、糖原合酶和磷酸化酶 b 激酶去磷酸化的磷蛋白磷酸酶-1 的活性也受到精细调节。磷蛋白磷酸酶抑制物是胞内的一种蛋白质，和此酶结合后可抑制其活性。此抑制物本身具活性的磷酸化形式也是由依赖 cAMP 的蛋白激酶调控的。共价修饰过程归纳如图 4-13。

糖原合成与分解的生理性调节主要靠胰岛素和胰高血糖素。胰岛素抑制糖原分解，促



●图 4-13 糖原合成、分解的共价修饰调节

进糖原合成，但其机制还未完全肯定。胰高血糖素可诱导生成 cAMP，促进糖原分解。肾上腺素也可通过 cAMP 促进糖原分解，但可能仅在应激状态下发挥作用。

肌糖原代谢的两个关键酶的调节与肝糖原不同。这是因为肌糖原的生理功能不同于肝糖原，肌糖原不能补充血糖，而仅仅是为肌活动提供能量。因此，在糖原分解代谢时肝主要受胰高血糖素的调节，而肌主要受肾上腺素调节。肌内糖原合酶及磷酸化酶的变构效应物主要为 AMP、ATP 及 6-磷酸葡萄糖。AMP 可激活磷酸化酶 b，而 ATP、6-磷酸葡萄糖可抑制磷酸化酶 a，但对糖原合酶有激活作用，使肌糖原的合成与分解受细胞内能量状态的控制。当肌收缩、ATP 被消耗时，AMP 浓度升高，而 6-磷酸葡萄糖水平亦低，这就使得肌糖原分解加快，合成被抑制。而当静息时，肌内 ATP 及 6-磷酸葡萄糖水平较高，有利于糖原合成。

Ca^{2+} 的升高可引起肌糖原分解增加。当神经冲动引起胞液内 Ca^{2+} 升高时，因为磷酸化酶 b 激酶的 δ 亚基就是钙调蛋白（calmodulin），Ca^{2+} 与其结合，即可激活磷酸化酶 b 激酶，促进磷酸化酶 b 磷酸化成磷酸化酶 a，加速糖原分解。这样，在神经冲动引起肌收缩的同时，即加速糖原分解，以获得肌收缩所需能量。

四、糖原累积症是由先天性酶缺陷所致

糖原累积症（glycogen storage disease）是一类遗传性代谢病，其特点为体内某些器官组织中有大量糖原堆积。引起糖原累积症的原因是患者先天性缺乏与糖原代谢有关的酶类。根据所缺陷的酶在糖原代谢中的作用，受累的器官不同，糖原的结构亦有差异，对健康或生命的影响程度也不同。例如，缺乏肝磷酸化酶时，婴儿仍可成长，肝糖原沉积导致肝大，并无严重后果。缺乏葡萄糖-6-磷酸酶，以致不能动用糖原维持血糖，则将引起严重后果。溶酶体的 α-葡萄糖苷酶可分解 α-1,4-糖苷键和 α-1,6-糖苷键。缺乏此酶所有组织均受损，常因心肌受损而突然死亡。糖原累积症分型见表 4-2：

表 4-2 糖原累积症分型

型别	缺陷的酶	受害器官	糖原结构
Ⅰ	葡萄糖 6 磷酸酶缺陷	肝、肾	正常
Ⅱ	溶酶体 α1→4 和 1→6 葡萄糖苷酶	所有组织	正常
Ⅲ	脱支酶缺失	肝、肌肉	分支多，外周糖链短
Ⅳ	分支酶缺失	所有组织	分支少，外周糖链特别长
Ⅴ	肌磷酸化酶缺失	肌肉	正常
Ⅵ	肝磷酸化酶缺陷	肝	正常
Ⅶ	肌肉和红细胞磷酸果糖激酶缺陷	肌肉、红细胞	正常
Ⅷ	肝磷酸化酶激酶缺陷	脑、肝	正常

第六节 糖 异 生

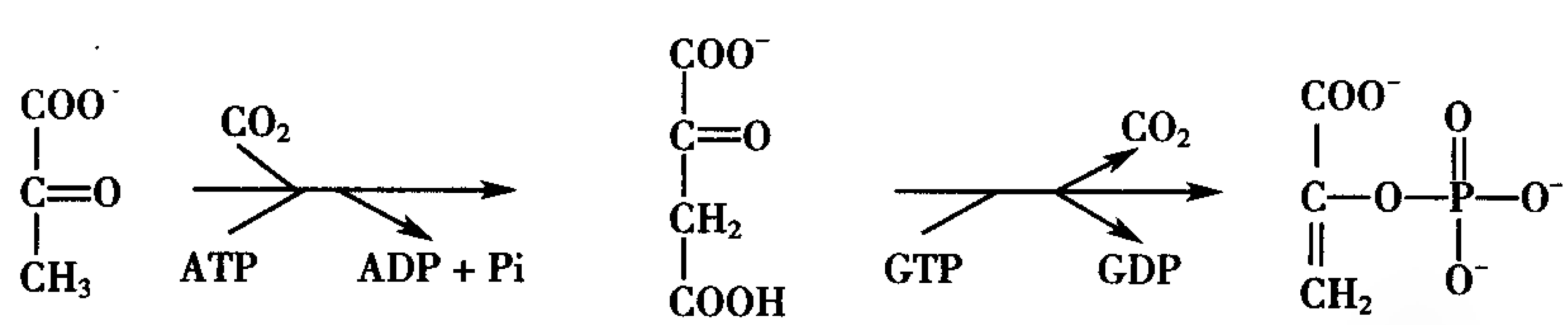
体内糖原的储备有限，正常成人每小时可由肝释出葡萄糖 210mg/kg 体重，如果没有补充，十几小时肝糖原即被耗尽，血糖来源断绝。事实上即使禁食 24 小时，血糖仍保持于正常范围，长期饥饿时也仅略下降。这时除了周围组织减少对葡萄糖的利用外，主要还是依赖肝将氨基酸、乳酸等转变成葡萄糖，不断地补充血糖。这种从非糖化合物（乳酸、甘油、生糖氨基酸等）转变为葡萄糖或糖原的过程称为糖异生（gluconeogenesis）。机体内进行糖异生补充血糖的主要器官是肝，肾在正常情况下糖异生能力只有肝的 1/10，长期饥饿时肾糖异生能力则可大为增强。

一、糖异生途径不完全是糖酵解的逆反应

从丙酮酸生成葡萄糖的具体反应过程称为糖异生途径（gluconeogenic pathway）。葡萄糖经酵解途径分解生成丙酮酸时，$\Delta G^{\ominus'}$ 为 -502kJ/mol（-120kcal/mol）。从热力学角度而言，由丙酮酸生成葡萄糖不可能全部循糖酵解途径逆行。糖酵解途径与糖异生途径的多数反应是共有的可逆反应，但糖酵解途径中有 3 个不可逆反应，在糖异生途径中须由另外的反应和酶代替。

（一）丙酮酸经丙酮酸羧化支路变为磷酸烯醇式丙酮酸

糖酵解途径中磷酸烯醇式丙酮酸由丙酮酸激酶催化生成丙酮酸。在糖异生途径中其逆过程由两个反应组成：



丙酮酸　　草酰乙酸　　磷酸烯醇式丙酮酸

催化第一个反应的是丙酮酸羧化酶（pyruvate carboxylase），其辅酶为生物素。反应分两步，CO_2 先与生物素结合，需消耗 ATP，然后活化的 CO_2 再转移给丙酮酸生成草酰乙酸。

第二个反应由磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶催化草酰乙酸转变成磷酸烯醇式丙酮酸。反应中消耗一个高能磷酸键，同时脱羧。上述两步反应共消耗 2 个 ATP。

由于丙酮酸羧化酶仅存在于线粒体内，故胞液中的丙酮酸必须进入线粒体，才能羧化生成草酰乙酸。而磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶在线粒体和胞液中都存在，因此草酰乙酸可在线粒体中直接转变为磷酸烯醇式丙酮酸再进入胞液，也可在胞液中被转变为磷酸烯醇式丙酮酸。但是，草酰乙酸不能直接透过线粒体膜，需借助两种方式将其转运入胞液：一种是经苹果酸脱氢酶作用，将其还原成苹果酸，然后通过线粒体膜进入胞液，再由胞液中苹果酸脱氢酶将苹果酸脱氢氧化为草酰乙酸而进入糖异生反应途径；另一种方式是经谷草转氨酶的作用，生成天冬氨酸后再逸出线粒体，进入胞液中的天冬氨酸再经胞液中谷草转氨酶的催化而恢复生成草酰乙酸。在糖异生途径的随后反应中，1,3-二磷酸甘油酸还原成 3-磷酸甘油醛时，需 $NADH+H^+$ 提供氢原子。当以乳酸为原料异生成糖时，其脱氢生成丙酮酸时已在胞液中产生了 $NADH+H^+$ 以供利用；而以丙酮酸或生糖氨基酸为原料进行糖异生时，$NADH+H^+$ 则必须由线粒体内提供，这些 $NADH+H^+$ 可来自脂酸 β-氧化或三羧酸循环。但 $NADH+H^+$ 需经不同的途径转移至胞液。有实验表明，以丙酮酸或能转变为丙酮酸的某些生糖氨基酸作为原料异生成糖时，以苹果酸通过线粒体方式进行糖异生；而乳酸进行糖异生反应时，常在线粒体生成草酰乙酸后，再变成天冬氨酸逸出线粒体内膜进入胞质。至于胞液内草酰乙酸回至线粒体的路线较复杂，在此不详述。

（二）1,6-二磷酸果糖转变为 6-磷酸果糖

此反应由果糖二磷酸酶-1 催化。C_1 位的磷酸酯进行水解是放能反应，并不生成 ATP，所以反应易于进行。

（三）6-磷酸葡萄糖水解为葡萄糖

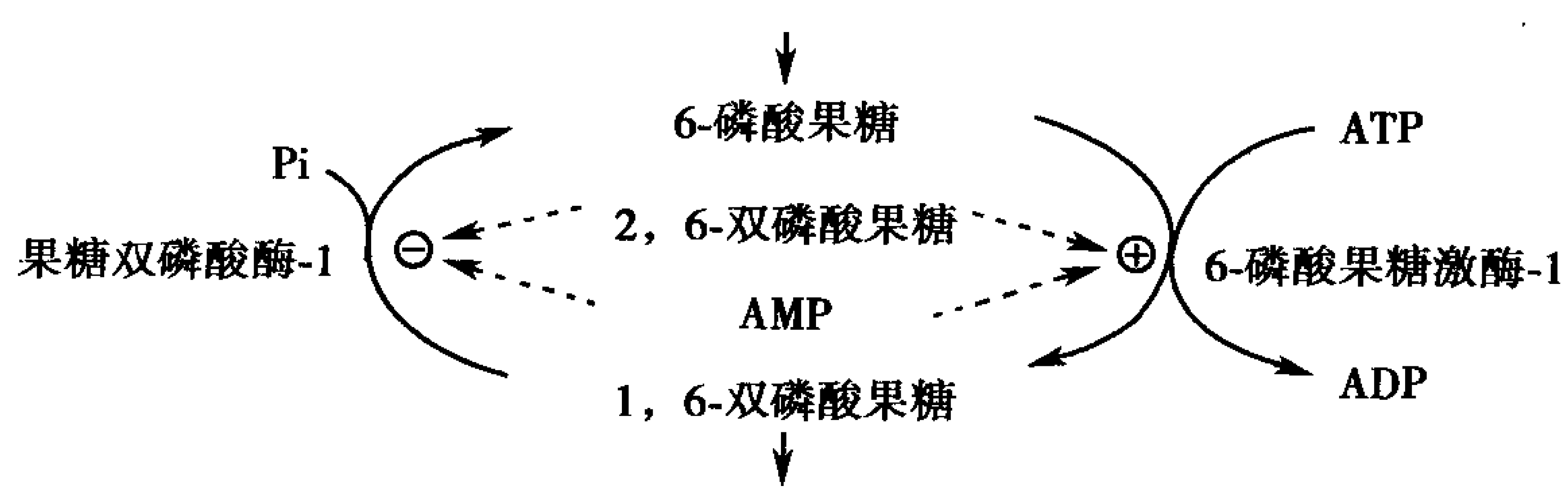
此反应由葡萄糖-6-磷酸酶催化。同样，由于不生成 ATP，不是葡萄糖激酶的逆反应，热力学上是可行的。

在以上反应过程中，作用物的互变反应分别由不同的酶催化其单向反应，这种互变循环被称为底物循环（substrate cycle）。当两种酶活性相等时，就不能将代谢向前推进，结果仅是 ATP 分解释放出能量，因而又称为无效循环（futile cycle）。而在细胞内两酶活性不完全相等，使代谢反应仅向一个方向进行。糖异生途径可归纳如图 4-14。

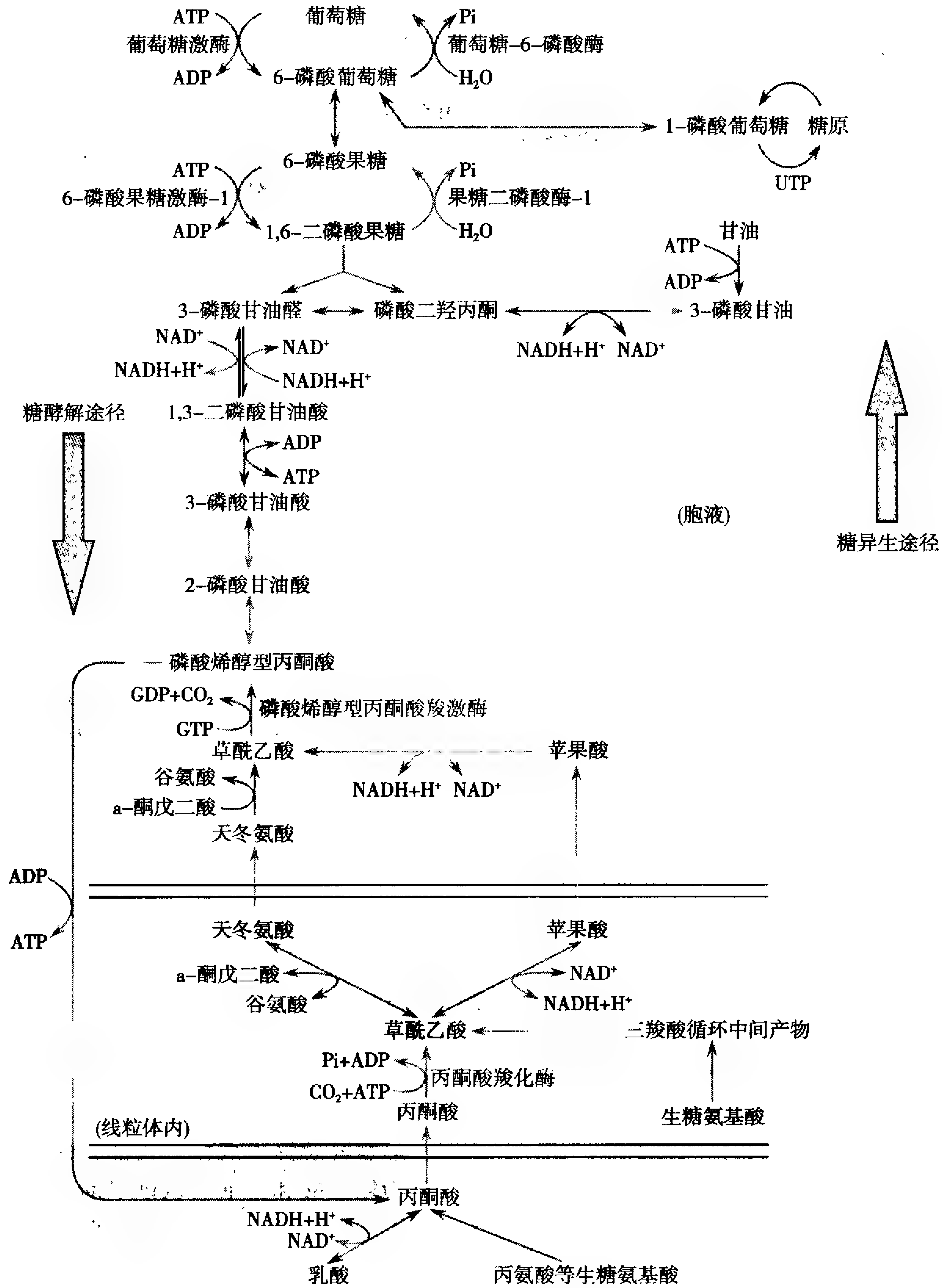
二、糖异生的调节是通过对两个底物循环的调节与糖酵解调节彼此协调

糖酵解途径与糖异生途径是方向相反的两条代谢途径。如从丙酮酸进行有效的糖异生，就必须抑制糖酵解途径，以防止葡萄糖又重新分解成丙酮酸；反之亦然。这种协调主要依赖于对这两条途径中的两个底物循环进行调节。

（一）第一个底物循环在 6-磷酸果糖与 1,6-二磷酸果糖之间进行



一方面 6-磷酸果糖磷酸化成 1,6-二磷酸果糖；另一方面 1,6-二磷酸果糖去磷酸而成 6-磷酸果糖。这样，磷酸化与去磷酸构成了一个底物循环。如不加调节，净结果是消耗了 ATP 而又不能推进代谢。实际上在细胞内催化这两个反应的酶活性常呈相反的变化。2,6-二磷酸果糖和 AMP 激活 6-磷酸果糖激酶-1 的同时，抑制果糖-二磷酸酶-1 的活性，使反

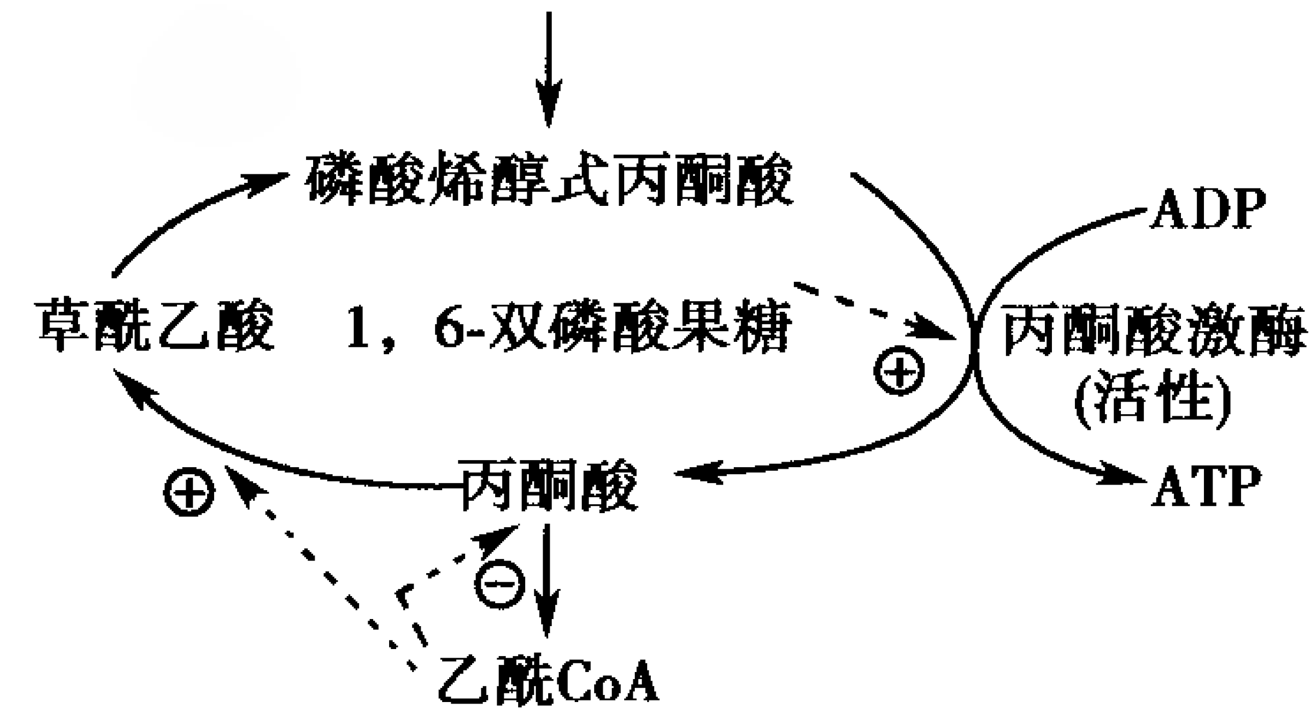


●图 4-14 糖异生途径

应向糖酵解方向进行，同时抑制了糖异生。胰高血糖素通过 cAMP 和依赖 cAMP 的蛋白激酶，使 6-磷酸果糖激酶-2 磷酸化而失活，降低肝细胞内 2,6-二磷酸果糖水平，从而促进糖异生而抑制糖的分解。胰岛素则有相反的作用。目前认为 2,6-二磷酸果糖的水平是肝内调节糖的分解或糖异生反应方向的主要信号。进食后，胰高血糖素/胰岛素比例降低，2,6-二磷酸果糖水平升高，糖异生被抑制，糖的分解加强，为合成脂酸提供乙酰 CoA。饥饿时胰高血糖素分泌增加，2,6-二磷酸果糖水平降低，从糖的分解转向糖异生。维持底物循

环虽然要损失一些 ATP，但却可使代谢调节更为灵敏、精细。

（二）在磷酸烯醇式丙酮酸和丙酮酸之间进行第二个底物循环



1,6-二磷酸果糖是丙酮酸激酶的变构激活剂，通过 1,6-二磷酸果糖可将两个底物循环相联系和协调。胰高血糖素可抑制 2,6-二磷酸果糖合成，从而减少 1,6-二磷酸果糖的生成，这就可降低丙酮酸激酶的活性。胰高血糖素还通过 cAMP 使丙酮酸激酶磷酸化而失去活性，于是糖异生加强而糖酵解被抑制。肝内丙酮酸激酶可被丙氨酸抑制。而在饥饿时丙氨酸是主要的糖异生原料，故丙氨酸的这种抑制作用有利于丙氨酸异生成糖。

丙酮酸羧化酶必须有乙酰 CoA 存在才有活性，而乙酰 CoA 对丙酮酸脱氢酶却有反馈抑制作用。例如饥饿时大量脂酰 CoA 在线粒体内 β-氧化，生成大量的乙酰 CoA。这一方面抑制丙酮酸脱氢酶，阻止丙酮酸继续氧化，一方面又激活丙酮酸羧化酶，使其转变为草酰乙酸，从而加速糖异生。

胰高血糖素可通过 cAMP 快速诱导磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因的表达，增加酶的合成。胰岛素则显著降低磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 mRNA 水平，而且对 cAMP 有对抗作用，说明胰岛素对该酶有重要的调节作用。

三、糖异生的生理意义主要在于维持血糖水平恒定

（一）维持血糖水平的恒定是糖异生最主要的生理作用

空腹或饥饿时依赖氨基酸、甘油等异生成葡萄糖，以维持血糖水平恒定。正常成人的脑组织不能利用脂酸，主要依赖葡萄糖供给能量；红细胞没有线粒体，完全通过糖酵解获得能量；骨髓、神经等组织由于代谢活跃，经常进行糖酵解。这样，即使在饥饿状况下，机体也需消耗一定量的糖，以维持生命活动。此时这些糖全部依赖糖异生生成。

糖异生的主要原料为乳酸、氨基酸及甘油。乳酸来自肌糖原分解。肌内糖异生活性低，生成的乳酸不能在肌内重新合成糖，经血液转运至肝后异生成糖。这部分糖异生主要与运动强度有关。而在饥饿时，糖异生的原料主要为氨基酸和甘油。饥饿早期，随着脂肪组织中脂肪的分解加速，运送至肝的甘油增多，每天约可生成 10～15g 葡萄糖。但糖异生的主要原料为氨基酸。肌的蛋白质分解成氨基酸后以丙氨酸和谷氨酰胺形式运行至肝，每天约生成 90～120g 葡萄糖，约需分解 180～200g 蛋白质。长期饥饿时每天消耗这么多蛋白质是无法维持生命的。经过适应，脑每天消耗的葡萄糖可减少，其余依赖酮体供能。这时甘油仍可异生提供约 20g 葡萄糖，所以每天消耗的蛋白质可减少至 35g 左右。

（二）糖异生是补充或恢复肝糖原储备的重要途径

糖异生是肝补充或恢复糖原储备的重要途径，这在饥饿后进食更为重要。长期以来，进食后肝糖原储备丰富的现象被认为是肝直接利用葡萄糖合成糖原的结果，但后来发现并非如此。肝灌注和肝细胞培养实验表明：只有当葡萄糖浓度达 12mmol/L 以上时，才观察到肝细胞摄取葡萄糖。这样高的浓度在体内是很难达到的。即使在消化吸收期，门脉内葡

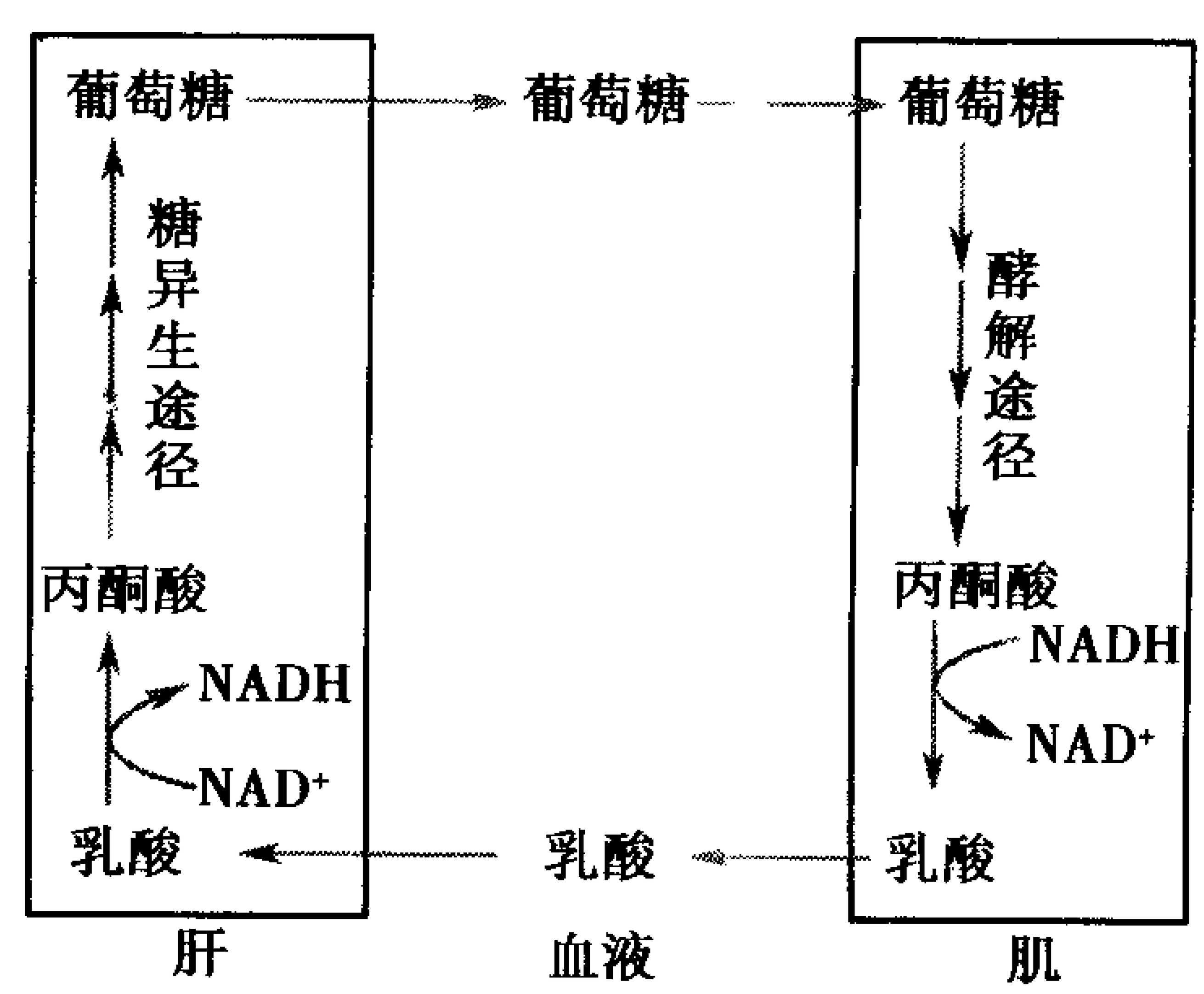
萄糖浓度也仅 8mmol/L。其原因被认为是由于葡萄糖激酶的 K_m 太高，肝摄取葡萄糖能力低。葡萄糖激酶活性是决定肝细胞摄取、利用葡萄糖的主要因素。另一方面，如在灌注液中加入一些可异生成糖原的甘油、谷氨酸、丙酮酸和乳酸，则肝糖原迅速增加。以同位素标记不同碳原子的葡萄糖输入动物后，分析其肝糖原中葡萄糖标记的情况，结果表明：摄入的相当一部分葡萄糖先分解成丙酮酸、乳酸等三碳化合物，后者再异生成糖原。这既解释了肝摄取葡萄糖的能力低，但仍可合成糖原，又可解释为什么进食 2～3 小时内，肝仍要保持较高的糖异生活性。合成糖原的这条途径称为三碳途径，也有学者称为间接途径。而葡萄糖经 UDPG 合成糖原的过程称为直接途径。

（三）肾糖异生增强有利于维持酸碱平衡

长期饥饿时，肾糖异生增强，有利于维持酸碱平衡。长期禁食后，肾的糖异生作用增强。发生这一变化的原因可能是饥饿造成的代谢性酸中毒造成的。此时体液 pH 降低，促进肾小管中磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的合成，从而使糖异生作用增强。另外，当肾中 α-酮戊二酸因异生成糖而减少时，可促进谷氨酰胺脱氨生成谷氨酸以及谷氨酸的脱氨反应，肾小管细胞将 NH_3 分泌入管腔中，与原尿中 H^+ 结合，降低原尿 H^+ 的浓度，有利于排氢保钠作用的进行，对于防止酸中毒有重要的作用。

四、肌中产生的乳酸运输至肝进行糖异生形成乳酸循环

肌收缩（尤其是供氧不足时）通过糖酵解生成乳酸。肌内糖异生活性低，所以乳酸通过细胞膜弥散进入血液后，再入肝，在肝内异生为葡萄糖。葡萄糖释入血液后又可被肌摄取，这就构成了一个循环，此循环称为乳酸循环，也称 Cori 循环（图 4-15）。乳酸循环的形成是由于肝和肌组织中酶的特点所致。肝内糖异生活跃，又有葡萄糖-6-磷酸酶可水解 6-磷酸葡萄糖，释出葡萄糖。肌除糖异生活性低外，又没有葡萄糖 6-磷酸酶，因此肌内生成的乳酸既不能异生成糖，更不能释放出葡萄糖。乳酸循环的生理意义就在于避免损失乳酸以及防止因乳酸堆积引起酸中毒。乳酸循环是耗能的过程，2 分子乳酸异生成葡萄糖需消耗 6 分子 ATP。



●图 4-15　乳酸循环

第七节　其他单糖的代谢

包括葡萄糖在内，己糖如果糖、半乳糖和甘露糖都是重要的代谢燃料，经消化，这些单糖进入血流，被带到各种组织中去。果糖、半乳糖和甘露糖都是通过转变为糖酵解途径的中间产物而进入糖酵解途径代谢。

一、果糖被磷酸化后进入糖酵解途径

果糖是膳食中一个重要的燃料来源，水果和蔗糖中含有大量果糖，从食物摄入的果糖每天约有 100g。果糖的代谢一部分在肝，一部分被周围组织主要为肌和脂肪组织摄取。

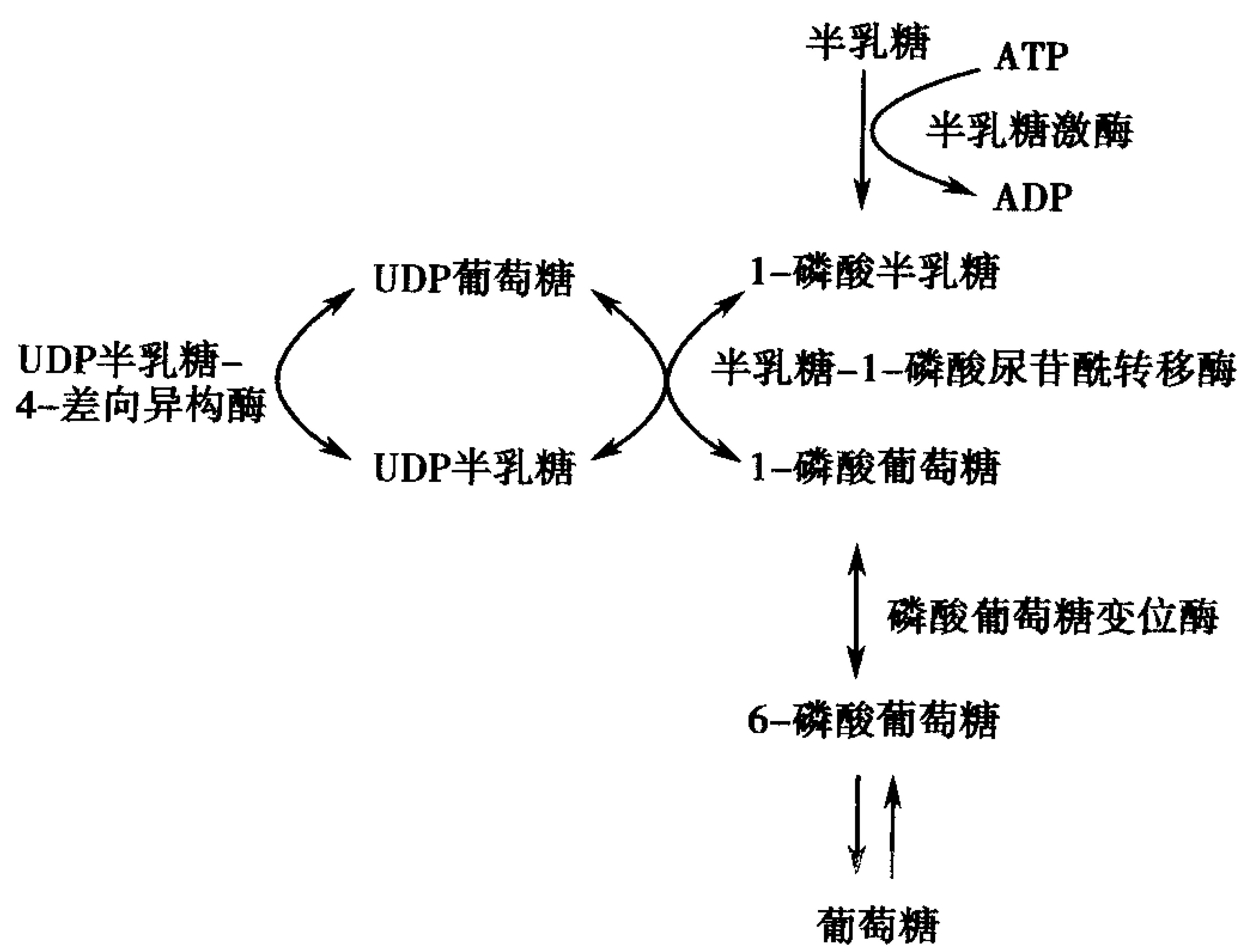
在肌和脂肪组织中己糖激酶使果糖磷酸化生成 6-磷酸果糖。6-磷酸果糖可循糖酵解途径分解，在肌也可合成糖原。

肝中含有的葡萄糖激酶，与已糖（包括果糖）的亲和力很低，因此果糖在肝中的代谢必然不同于肌。在肝中存在特异的果糖激酶使果糖磷酸化成1-磷酸果糖，后者被特异的1-磷酸果糖醛缩酶（B型醛缩酶）分解成磷酸二羟丙酮及甘油醛。甘油醛在丙糖激酶催化下磷酸化成3-磷酸甘油醛。最终都进入糖酵解途径氧化或逆行合成糖原。也可能降解为三碳化合物后在肝进行糖异生，因离体试验证明果糖可促进肝内糖原储存。

果糖不耐受性（fructose intolerance）是一种遗传病，这种病因为缺乏B型醛缩酶，吃果糖也会造成1磷酸果糖堆积，大量消耗肝中磷酸的储备，进而使ATP浓度下降，从而加速乳酸酵解，造成乳酸酸中毒和餐后低血糖。这种病症常表现为自我限制，即果糖不耐受的人很快发展成强烈的对任何甜食的厌恶感。

二、半乳糖可转变为1-磷酸葡萄糖成为糖酵解的中间代谢产物

半乳糖和葡萄糖是立体异构体，它们仅仅在 C_4 位的构型上有所区别。牛乳中的乳糖是半乳糖的主要来源，半乳糖在肝内转变为葡萄糖。其途径如图4-16。尿嘧啶核苷二磷酸半乳糖(uridine diphosphate galactose，UDPGal)不仅是半乳糖转变为葡萄糖的中间产物，也是半乳糖供体，可用以合成糖脂、蛋白聚糖和糖蛋白。另一方面，由于差向异构酶反应可自由逆转，用于合成糖脂、蛋白聚糖和糖蛋白的半乳糖并不必依赖食物而可由UDPG转变生成。



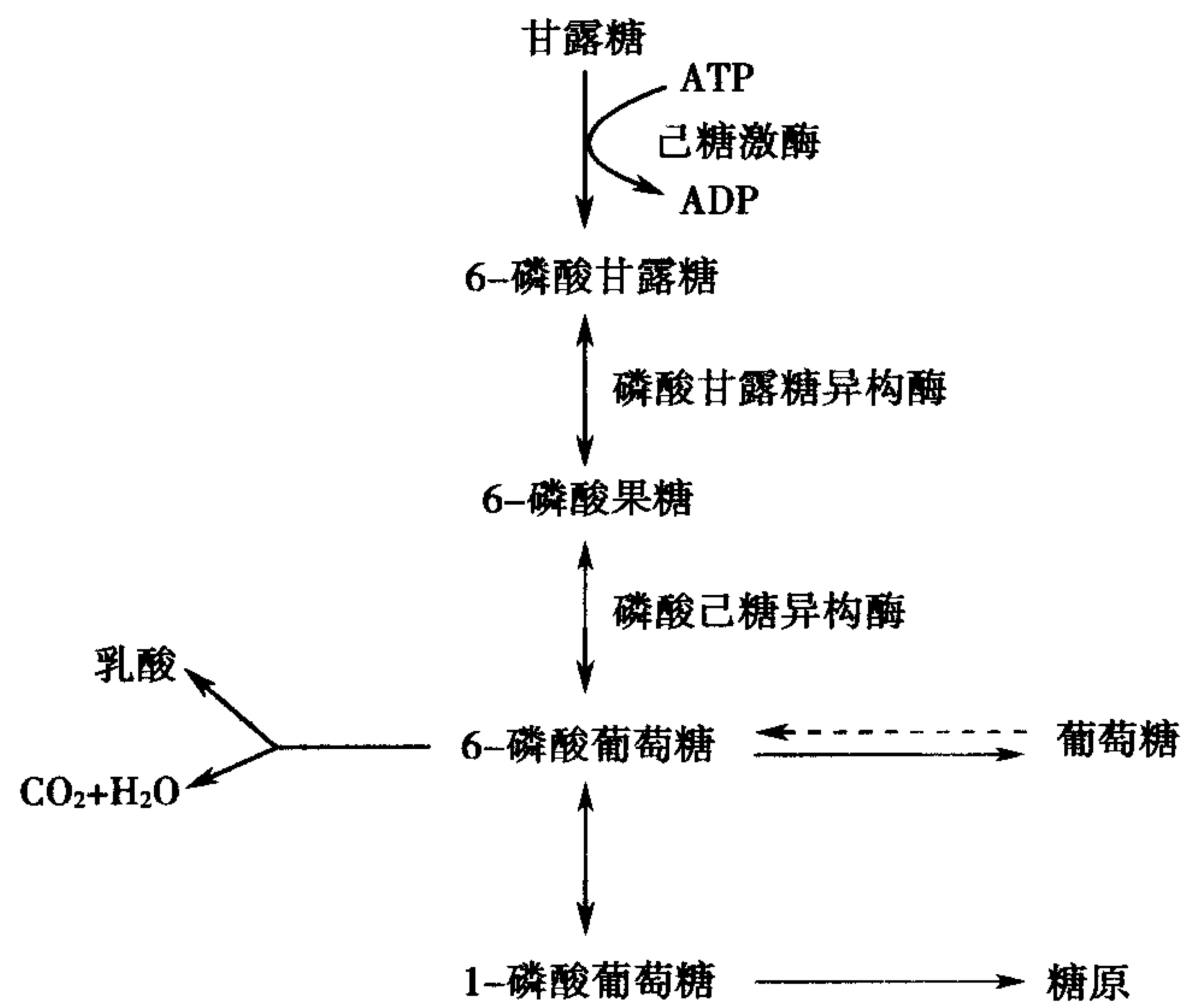
●图4-16 半乳糖的代谢

半乳糖血症（galactosemia）是一种遗传性疾病，它的特征是不能将半乳糖转变为葡萄糖，其原因为半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶的缺陷。结果使半乳糖-1-磷酸生成UDP-半乳糖的过程受阻，导致有毒副产物的积累。例如，血液中半乳糖浓度的增加导致眼睛晶状体中含较高浓度的半乳糖，并还原为半乳糖醇，晶状体中这种糖醇的存在最终导致白内障的形成（晶状体混浊）。半乳糖血症的症状还包括生长停滞，智力迟钝，在某些病例中会因肝损伤致死。

三、甘露糖可转变为6-磷酸果糖进入糖酵解途径

甘露糖在结构上是葡萄糖 C_2 位的立体异构物。日常饮食中含量甚微，它是多糖和糖

蛋白的消化产物。甘露糖在体内的代谢可通过两步反应转变成6-磷酸果糖进入糖酵解途径。在己糖激酶的催化下，甘露糖可被ATP磷酸化为6磷酸甘露糖，磷酸甘露糖异构酶再催化6-磷酸甘露糖转变为6-磷酸果糖，6-磷酸果糖则可进入糖酵解途径进行代谢转变，生成糖原、乳酸、葡萄糖、戊糖等。其转变途径如图4-17。

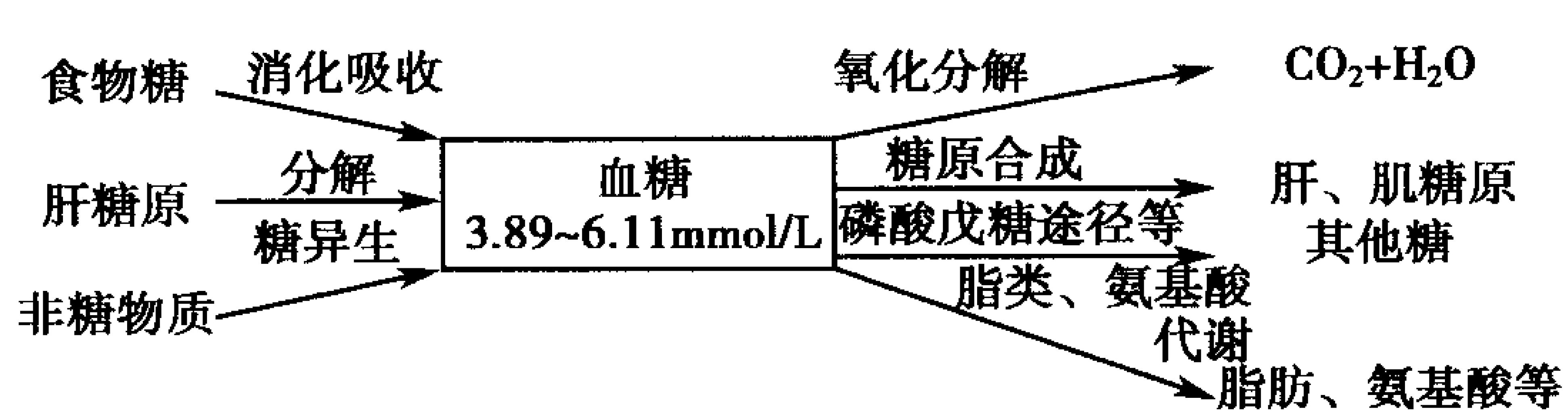


●图4-17　甘露糖的代谢

第八节　血糖及其调节

一、血糖的来源和去路是相对平衡的

血糖（blood sugar）指血中的葡萄糖。血糖水平相当恒定，维持在3.89～6.11mmol/L之间，这是进入和移出血液的葡萄糖平衡的结果。血糖是肠道吸收、肝糖原分解或肝内糖异生生成的葡萄糖释入血液内的。血糖为周围组织以及肝组织所摄取利用。这些组织中摄取的葡萄糖的利用、代谢各异。某些组织用于氧化供能；肝、肌组织可用于合成糖原；脂肪组织和肝可将其转变为甘油三酯等。



二、血糖水平的平衡主要是受到激素调节

以上这些代谢过程在机体经常是不断进行的，但是在不同的情况下，根据机体能量来源、消耗等也有很大的差异，而且糖代谢的调节不是孤立的，它还涉及脂肪及氨基酸的代谢。血糖水平保持恒定是糖、脂肪、氨基酸代谢协调的结果，也是肝、肌、脂肪组织等各器官组织代谢协调的结果。例如，消化吸收期间，自肠道吸收大量葡萄糖，此时肝内糖原合成加强（包括UDPG途径和三碳途径）而分解减弱；肌糖原合成和糖的氧化亦加强；

肝、脂肪组织加速将糖转变为脂肪；从肌蛋白质分解来的氨基酸的糖异生则减弱。因而血糖仅暂时上升并且很快恢复正常。长跑者经长达2个多小时的比赛，其肝糖原本应早已耗尽，但血糖水平仍保持在3.89～6.11mmol/L的范围。此时肌内能量来源主要来自脂酸，而糖异生来的葡萄糖保持血糖于较低水平。长期饥饿时，血糖水平虽较低，仍保持3.6～3.8mmol/L。这时，血糖来自肌蛋白质降解来的氨基酸，其次为甘油，以保证脑的需要，而其他组织的能量来源则为脂酸及酮体，它们摄取葡萄糖被抑制。甚至脑的能量，一部分也由酮体供应。这样的结果是血糖仍可维持于低水平。机体的各种代谢以及各器官之间能这样精确协调，以适应能量、燃料供求的变化，主要依靠激素的调节。酶水平的调节是最基本的调节方式和基础，调节血糖水平的几种激素的作用机制叙述如下：

（一）胰岛素是体内唯一降低血糖的激素

胰岛素（insulin）是体内唯一的降低血糖的激素，也是唯一同时促进糖原、脂肪、蛋白质合成的激素。胰岛素的分泌受血糖控制，血糖升高立即引起胰岛素分泌；血糖降低，分泌即减少。胰岛素降血糖是多方面作用的结果：①促进肌、脂肪组织等的细胞膜葡萄糖载体将葡萄糖转运入细胞；②通过增强磷酸二酯酶活性，降低cAMP水平，从而使糖原合酶活性增强、磷酸化酶活性降低，加速糖原合成、抑制糖原分解；③通过激活丙酮酸脱氢酶磷酸酶而使丙酮酸脱氢酶激活，加速丙酮酸氧化为乙酰CoA，从而加快糖的有氧氧化；④抑制肝内糖异生，这是通过抑制磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的合成以及促进氨基酸进入肌组织并合成蛋白质，减少肝糖异生的原料；⑤通过抑制脂肪组织内的激素敏感性脂肪酶，可减缓脂肪动员的速率。当脂酸大量动员至肝、肌、心肌时，可抑制它们氧化葡萄糖。因此，胰岛素减少脂肪动员，就可促进上述组织利用葡萄糖。

（二）机体在不同状态下有相应的升高血糖的激素

1. 胰高血糖素（glucagon） 是体内主要升高血糖的激素。血糖降低或血内氨基酸升高刺激胰高血糖素的分泌。其升高血糖的机制包括：①经肝细胞膜受体激活依赖cAMP的蛋白激酶，从而抑制糖原合酶和激活磷酸化酶，迅速使肝糖原分解，血糖升高；②通过抑制6-磷酸果糖激酶-2，激活果糖二磷酸酶-2，从而减少2,6-二磷酸果糖的合成，后者是6-磷酸果糖激酶1的最强的变构激活剂，又是果糖二磷酸酶-1的抑制剂。于是糖酵解被抑制，糖异生则加速；③促进磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的合成，抑制肝L型丙酮酸激酶，加速肝摄取血中的氨基酸，从而增强糖异生；④通过激活脂肪组织内激素敏感性脂肪酶，加速脂肪动员。这与胰岛素作用相反，从而间接升高血糖水平。

胰岛素和胰高血糖素是调节血糖，实际上也是调节三大营养物代谢最主要的两种激素。机体内糖、脂肪、氨基酸代谢的变化主要取决于这两种激素的比例。而不同情况下这两种激素的分泌是相反的。引起胰岛素分泌的信号（如血糖升高）可抑制胰高血糖素分泌。反之，使胰岛素分泌减少的信号可促进胰高血糖素分泌。

2. 糖皮质激素可引起血糖升高 其作用机制可能有两方面。①促进肌蛋白质分解，分解产生的氨基酸转移到肝进行糖异生，这时，糖异生途径的关键酶，磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的合成常增强；②抑制肝外组织摄取和利用葡萄糖，抑制点为丙酮酸的氧化脱羧。此外，在糖皮质激素存在时，其他促进脂肪动员的激素才能发挥最大的效果。这种协助促进脂肪动员的作用，可使得血中游离脂酸升高，也可间接抑制周围组织摄取葡萄糖。

3. 肾上腺素是强有力的升高血糖的激素 给动物注射肾上腺素后血糖水平迅速升高，可持续几小时。同时血中乳酸水平也升高。肾上腺素的作用机制是通过肝和肌的细胞膜受体、cAMP、蛋白激酶级联激活磷酸化酶，加速糖原分解。在肝内糖原分解为葡萄糖；在肌则经糖酵解生成乳酸，并通过乳酸循环间接升高血糖水平。肾上腺素主要在应激状态下

发挥调节作用。对经常性，尤其是进食情况引起的血糖波动没有生理意义。

三、血糖水平异常及糖尿病是最常见的糖代谢紊乱

正常人体内存在一整套精细的调节糖代谢的机制，在一次性食入大量葡萄糖之后，血糖水平不会出现大的波动和持续升高。人体对摄入的葡萄糖具有很大耐受能力的这种现象，被称为葡萄糖耐量（glucose tolerance）或耐糖现象。临床上因糖代谢障碍可发生血糖水平紊乱，常见有以下两种类型：

（一）低血糖是指血糖浓度低于 3.0mmol/L

空腹血糖浓度低于 3.0mmol/L 时称为低血糖（hypoglycemia）。低血糖影响脑的正常功能，因为脑细胞所需要的能量主要来自葡萄糖的氧化。当血糖水平过低时，就会影响脑细胞的功能，从而出现头晕、倦怠无力、心悸等，严重时出现昏迷，称为低血糖休克。如不及时给病人静脉补充葡萄糖，可导致死亡。出现低血糖的病因有：①胰性（胰岛 β-细胞功能亢进、胰岛 α-细胞功能低下等）；②肝性（肝癌、糖原累积病等）；③内分泌异常（垂体功能低下、肾上腺皮质功能低下等）；④肿瘤（胃癌等）；⑤饥饿或不能进食者等。

（二）高血糖是指空腹血糖高于 6.9mmol/L

临床上将空腹血糖浓度高于 6.9mmol/L 称为高血糖（hyperglycemia）。当血糖浓度超过了肾小管的重吸收能力（肾糖阈），则可出现糖尿。持续性高血糖和糖尿，特别是空腹血糖和糖耐量曲线高于正常范围，主要见于糖尿病（diabetes mellitus）。遗传性胰岛素受体缺陷也可引起糖尿病的临床表现。某些慢性肾炎、肾病综合征等引起肾对糖的重吸收障碍也可出现糖尿，但血糖及糖耐量曲线均正常。生理性高血糖和糖尿可因情绪激动，交感神经兴奋，肾上腺素分泌增加，从而使得肝糖原大量分解所致。临床上静脉滴注葡萄糖速度过快，也可使血糖迅速升高并出现糖尿。

（三）糖尿病是最常见的糖代谢紊乱疾病

糖 尿 病

糖尿病（diabetes mellitus）是因胰岛素分泌不足及胰岛素受体缺陷所致的代谢性疾病。

我国的《黄帝内经》指出糖尿病的病因为“甘美肥胖，易患消渴”等。唐初大夫发现糖尿病患者“尿闻之有水果气，尝之有甜味”。公元 30～90 年 Aretaeus 命名为“diabetes”（尿症）。1674 年英国 T. Willis 发现患者的尿“甜如蜜”。接着 W. Cullen 在“diabetes”后加“mellitus”（蜜），命名为“diabetes mellitus”而一直沿用至今。

由于胰岛素不足导致血糖增高。当其超过肾糖阈时，则出现糖尿。由于糖的利用障碍而使脂肪动员增加，产生脂酸及酮体增多。同时酮体的氧化受阻，可出现酮血症及酮尿症。因酮体中多为酸性物质，常有代谢性酸中毒。

临床上糖尿病分为 1 型（胰岛素依赖型）和 2 型（非胰岛素依赖型）。近年研究表明，糖尿病的发病与某些基因相关，因此，糖尿病具有遗传倾向。

糖尿病是一种因部分或完全胰岛素缺失或细胞胰岛素受体减少或受体敏感性降低导致的疾病，它是除了肥胖症之外人类最常见的内分泌紊乱性疾病。

由于胰岛素调节血糖水平，故糖尿病患者的血糖水平升高。当血糖水平超过肾糖阈，

则使葡萄糖从尿液中排出。糖尿病的特征即为高血糖和糖尿。临床上将糖尿病分为两型，胰岛素依赖型（1 型）和非胰岛素依赖型（2 型）。1 型多发生于青少年，主要与遗传有关，定位于人类组织相容性复合体上的单个基因或基因群，是自身免疫病。2 型糖尿病和肥胖关系密切，可能是由细胞膜上胰岛素受体丢失所致。

糖尿病常伴有多种并发症，包括视网膜毛细血管病变、白内障、神经轴突萎缩和脱髓鞘（导致运动神经元、传感器和自主神经功能障碍）、动脉硬化性疾病和肾病。这些并发症的严重程度与血糖水平升高的程度直接相关。

小　　结

糖类是自然界一类重要的含碳化合物。其主要生物学功能是机体提供能源和碳源，也是组织和细胞的重要组成成分。

食物中可被消化的糖主要是淀粉，它经过消化道中一系列酶的消化作用，最终生成葡萄糖，在小肠被吸收。葡萄糖的吸收是依赖特定载体转运的、主动耗能的过程。

糖代谢主要指葡萄糖在体内的复杂代谢过程，包括分解代谢与合成代谢。其分解代谢途径主要有糖酵解、糖的有氧氧化及磷酸戊糖途径等。

糖酵解是指在机体缺氧情况下，葡萄糖经一系列酶促反应生成丙酮酸进而还原成乳酸的过程。其代谢反应过程可分为两个阶段：第一阶段是由葡萄糖分解为丙酮酸的反应过程，又称为糖酵解途径。在此阶段中，由己糖转变为磷酸丙糖的反应过程需消耗 ATP；而由 3-磷酸甘油醛转变为丙酮酸的反应过程则生成 ATP。第二阶段为丙酮酸加氢还原为乳酸。糖酵解全部反应在胞质中进行。调节糖酵解途径的关键酶是 6-磷酸果糖激酶-1、丙酮酸激酶、己糖激酶。糖酵解的生理意义在于迅速提供能量和为一些特殊组织细胞供能，1 分子葡萄糖经糖酵解可净生成 2 分子 ATP。

糖的有氧氧化是指葡萄糖在有氧条件下彻底氧化生成水和 CO_2 的反应过程，是糖氧化供能的主要方式。其反应过程分为三个阶段：第一阶段为葡萄糖循糖酵解途径分解为丙酮酸；第二阶段为丙酮酸进入线粒体在丙酮酸脱氢酶复合体催化下氧化脱羧生成乙酰 CoA、$NADH+H^+$ 和 CO_2；第三阶段为三羧酸循环和氧化磷酸化。三羧酸循环是以乙酰 CoA 和草酰乙酸缩合生成柠檬酸开始，经脱氢脱羧等一系列反应又生成草酰乙酸的循环过程。此循环中由三个关键酶（异柠檬酸脱氢酶、α-酮戊二酸脱氢酶、柠檬酸合酶）催化的反应是不可逆的。三羧酸循环的生理意义在于它是三大营养素的最终代谢通路；也是三大营养素相互转变的联系枢纽；还为其他合成代谢提供前体物质。三羧酸循环运转一周的净结果是消耗了 1 分子乙酰 CoA，生成 2 分子 CO_2、3 分子 $NADH+H^+$、1 分子 $FADH_2$ 和 1 分子 GTP。$NADH+H^+$ 和 $FADH_2$ 经氧化磷酸化生成 ATP 及 H_2O。调节糖有氧氧化的关键酶包括 6-磷酸果糖激酶 1、丙酮酸激酶、己糖激酶、丙酮酸脱氢酶复合体、异柠檬酸脱氢酶、α-酮戊二酸脱氢酶和柠檬酸合酶。

葡萄糖通过磷酸戊糖途径代谢可产生磷酸核糖和 NADPH。磷酸核糖是合成核苷酸的重要原料。NADPH 作为供氢体参与多种代谢反应。磷酸戊糖途径在胞质中进行，其关键酶是 6-磷酸葡萄糖脱氢酶。葡萄糖经多元醇途径可生成木糖醇、山梨醇等；经糖醛酸途径可生成葡萄糖醛酸。

糖原是体内糖的储存形式，主要贮存于肝和肌肉中。肝糖原的合成途径有直接途径（由葡萄糖经 UDPG 合成糖原）和间接途径（由三碳化合物经糖异生合成糖原）。糖原分解习惯上是指肝糖原分解成为葡萄糖，这是血糖的重要来源。肌糖原的合成是由葡萄糖经 UDPG 合成的；由于肌组织中缺乏葡萄糖-6-磷酸酶，肌糖原不能分解成葡萄糖，只能进

行糖酵解或有氧氧化。糖原合成与分解的关键酶分别为糖原合酶及磷酸化酶，两者均受共价修饰和变构调节。

糖异生是指由乳酸、甘油和生糖氨基酸等非糖化合物转变为葡萄糖或糖原的过程。进行糖异生的主要器官是肝，次为肾。糖异生途径与糖酵解途径的多数反应是共有的可逆反应，但糖酵解途径中 3 个关键酶所催化的反应是不可逆的，在糖异生途径中须由丙酮酸羧化酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶、果糖二磷酸酶-1 和葡萄糖-6-磷酸酶催化。糖酵解途径与糖异生途径是方向相反的两条代谢途径，通过 3 个底物循环进行有效的协调。糖异生的生理意义在于维持血糖水平的恒定，是补充或恢复肝糖原储备的重要途径。长期饥饿时，肾糖异生增强有利于维持酸碱平衡。

血糖是指血中的葡萄糖，其正常水平相对恒定在 3.89～6.11mmol/L 之间，这是血糖的来源和去路相对平衡的结果。血糖水平主要受多种激素的调控。胰岛素具有降低血糖的作用；而胰高血糖素、肾上腺素、糖皮质激素有升高血糖的作用。当人体糖代谢发生障碍时可导致高血糖或低血糖。糖尿病是最常见的糖代谢紊乱疾病。

（屈 伸）

第五章 脂类代谢

脂类（lipids）是一类非均一、物理和化学性质相近，并能为机体利用的有机化合物，是脂肪（fat）和类脂（lipoid）的总称。其共同特征是不溶于水而易溶于乙醚、氯仿、苯等非极性有机溶剂。脂肪即三脂酰甘油（triacylglycerol），也被称为甘油三酯（triglyceride）。类脂包括固醇（sterol）及其酯（ester）、磷脂（phospholipid）及糖脂（glycolipid）等。

脂肪酸（fatty acids，以下简称脂酸）包括饱和脂酸（saturated fatty acid）和不饱和脂酸（unsaturated fatty acid）。后者中多不饱和脂酸，机体自身不能合成，必须由食物提供，是动物不可缺少的营养素，故称为营养必需脂酸（essential fatty acid），包括亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸。它们是前列腺素（prostaglandins，PG）、血栓烷（thromboxane，TX）及白三烯（leukotrienes，LTs）等生理活性物质的前体。

脂酸在体内主要与醇结合成酯。与脂酸结合的醇有甘油（丙三醇）、鞘氨醇及胆固醇等。1 分子甘油被 3 分子脂酸酯化生成甘油三酯，其主要生理功能是储存能量及氧化供能。甘油与 2 分子脂酸、1 分子磷酸及含氮化合物结合成甘油磷脂（glycerophosphatide）。甘油磷脂包括磷脂酰胆碱（phosphatidylcholine）、磷脂酰乙醇胺（phosphatidylethanolamine）、磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine）、磷脂酰肌醇（phosphatidylinositol）及二磷脂酰甘油（diphosphatidyl glycerol）等，是构成生物膜脂双层的基本骨架。脂酸与鞘氨醇（sphingenine）通过酰胺键结合的脂称为鞘脂（sphingolipid），含磷酸者为鞘磷脂（phosphosphingolipid），含糖者称为鞘糖脂（glycosphingolipid）。鞘磷脂和鞘糖脂不仅是生物膜的重要组分，还参与细胞识别及信息传递。胆固醇及胆固醇酯虽然不能氧化供能，但能转化成为胆汁酸、类固醇激素和维生素 D_3 等，参与物质代谢的调节。

脂类不溶于水，但可与不同载脂蛋白（apolipoprotein，apo）结合形成不同的脂蛋白（lipoprotein），通过血液在各组织间进行转运。

第一节 不饱和脂酸的命名及分类

脂酸可以看作是脂肪烃分子末端氢原子被羧基取代后生成的化合物，其结构式为 $CH_3(CH_2)_nCOOH$，主要以酯的形式存在，游离脂酸较少。高等动植物中的脂酸的碳链长度一般在 14～20 之间，且为偶碳，碳链长度小于 14 或大于 20 的脂酸较少。

一、脂酸的系统命名遵循有机酸命名的原则

脂酸系统命名遵循有机酸命名的原则，即根据包括羧基碳原子在内的最长碳链作为主链碳原子数称为某烷酸，并从羧基碳原子开始编号；若碳链中含有双键，从羧基端编号，称为某碳烯酸，并将双键位置写在其前面。常用简写法表示脂酸，其原则为先写出碳原子的数目，再写出双键的数目，最后是双键的位置，可用希腊字母 Δ 标注双键位置。如：软脂酸含有 16 个碳原子，无双键，被称为十六烷酸，写成 16∶0；油酸含 18 个碳原子，在第 9～10 位间有一个双键，被称为 9-十八碳单烯酸，写成 18∶1（9）或 $18:1^{\Delta 9}$。

又将离羧基最近的碳原子称为 α 碳原子，依次为 β、γ、δ 碳原子，离羧基碳原子最远的碳原子称为甲基碳或 ω 碳原子（C_ω）。离羧基最远的双键距 C_ω 的碳原子数用 ω-数字或 n

标明。亚麻酸为 18 碳 3 烯多不饱和脂酸，其双键位置按碳原子编号分别为 9、12 和 15；按字母编号分别为 ω-3、ω-6 和 ω-9。根据碳原子编号命名为 9，12，15-十八碳三烯酸，写成 18∶3（9，12，15）或 18∶3$^{\Delta 9,12,15}$；按字母编号归类于 ω-3 不饱和脂酸，写成 18∶3，ω-3（图 5-1）。

ω-末端	CH_3—	CH_2—	CH_2=	CH_2—	CH_2—	CH_2=	CH_2—	CH_2—	CH_2=	CH_2—	CH_2—	CH_2—	CH_2—	CH_2—	CH_2—	CH_2—	CH_2—	COOH	羧基端
碳原子编号	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
ω-编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
字母编号	ω	ω-1	ω-2	ω-3	ω-4	ω-5	ω-6	ω-7	ω-8	ω-9				δ	γ	β	α		

●图 5-1　脂酸碳原子的编号

二、脂酸主要根据其碳链长度和饱和度分类

饱和脂酸之间的区别主要在于碳氢链的长度的不同；不饱和脂酸之间的区别主要在于碳氢链长度、双键的数目及其双键位置的不同。

（一）脂酸根据其碳链长度分为短链、中链和长链脂酸

一般将碳链长度小于或等于 10 的脂酸称为短链脂酸；将碳链长度大于或等于 20 的脂酸称为长链脂酸。

（二）脂酸根据其碳链是否存在双键分为饱和脂酸和不饱和脂酸

1. 饱和脂酸的碳链不含双键　饱和脂酸以乙酸（CH_3COOH）为基本结构，不同饱和脂酸的差别在于这两基团间亚甲基（—CH_2—）的数目不同，如软脂酸含 14 个亚甲基，硬脂酸含 16 个亚甲基，见表 5-1。

表 5-1　常见的脂酸

惯　名	系统名	碳原子数和双键数	簇	分子式
饱和脂酸				
月桂酸(lauric acid)	n-十二烷酸	12∶0		$CH_3(CH_2)_{10}COOH$
豆寇酸(myristic acid)	n-十四烷酸	14∶0		$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
软脂酸(palmitic acid)	n-十六烷酸	16∶0		$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
硬脂酸(stearic acid)	n-十八烷酸	18∶0		$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
花生酸(arachidic acid)	n-二十烷酸	20∶0		$CH_3(CH_2)_{18}COOH$
不饱和脂酸				
棕榈(软)油酸(palmitoleic acid)	9-十六碳一烯酸	16∶1	ω-7	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$
油酸(oleic acid)	9-十八碳一烯酸	18∶1	ω-9	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$
异油酸(vaccenic acid)	反式 11-十八碳一烯酸	18∶1	ω-7	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_9COOH$
亚油酸(linoleic acid)	9,12-十八碳二烯酸	18∶2	ω-6	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_2(CH_2)_6COOH$
α-亚麻酸(α-linolenic acid)	9,12,15-十八碳三烯酸	18∶3	ω-3	$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_3(CH_2)_6COOH$

续表

惯名	系统名	碳原子数和双键数	簇	分子式
γ-亚麻酸（γ-linolenic acid）	6,9,12-十八碳三烯酸	18：3	ω-6	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_3(CH_2)_3COOH$
花生四烯酸(arachidonic acid)	5,8,11,14-二十碳四烯酸	20：4	ω-6	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_4(CH_2)_2COOH$
timnodonic acid(EPA)	5,8,11,14,17-二十碳五烯酸	20：5	ω-3	$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_5(CH_2)_2COOH$
clupanodonic acid(DPA)	7,10,13,16,19-二十二碳五烯酸	22：5	ω-3	$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_5(CH_2)_4COOH$
cervonic acid(DHA)	4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸	22：6	ω-3	$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_6CH_2COOH$

2. 不饱和脂酸的碳链含有一个或一个以上双键 即含双键的脂酸被称为不饱和脂酸。含一个双键的脂酸称为单不饱和脂酸（monounsaturated fatty acid），如油酸；含两个或两个以上双键的脂酸称为多不饱和脂酸（polyunsaturated fatty acid），如4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸。根据其双键的位置不同分属于ω-3、ω-6、ω-7和ω-9簇不饱和脂酸，其母体脂酸分别为：

簇	母体不饱和脂酸	结构
ω-7	软油酸	9-16：1
ω-9	油酸	9-18：1
ω-6	亚油酸	9.12-18：2
ω-3	亚麻酸	9,12,15-18：3

相同簇的长链不饱和脂酸可由其母体代谢产生，如花生四烯酸（20：4，ω-6）可由ω-6簇母体多不饱和脂酸亚油酸（18：2，ω-6）产生。但ω-3、ω-6和ω-9簇多不饱和脂酸在体内彼此不能相互转化。

第二节 脂类的消化与吸收

一、脂类的消化发生在脂-水界面，且需胆汁酸盐参与

膳食中的脂类主要为脂肪，即甘油三酯，此外还含少量磷脂、胆固醇等。由于甘油三酯不溶于水，而消化酶为水溶性，因此甘油三酯的消化发生在脂-水界面（lipid-water interfaces）。甘油三酯形成脂-水界面依赖于胆汁中胆汁酸盐（bile salts）。胆汁酸盐是较强的乳化剂，能降低脂-水界面的张力，使甘油三酯及胆固醇酯等疏水的脂质乳化成细小微团（micelles），增加消化酶对脂质的接触面积，有利于脂肪及类脂的消化及吸收。胰液及胆汁均分泌入十二指肠，因此小肠上段是脂类消化的主要场所。

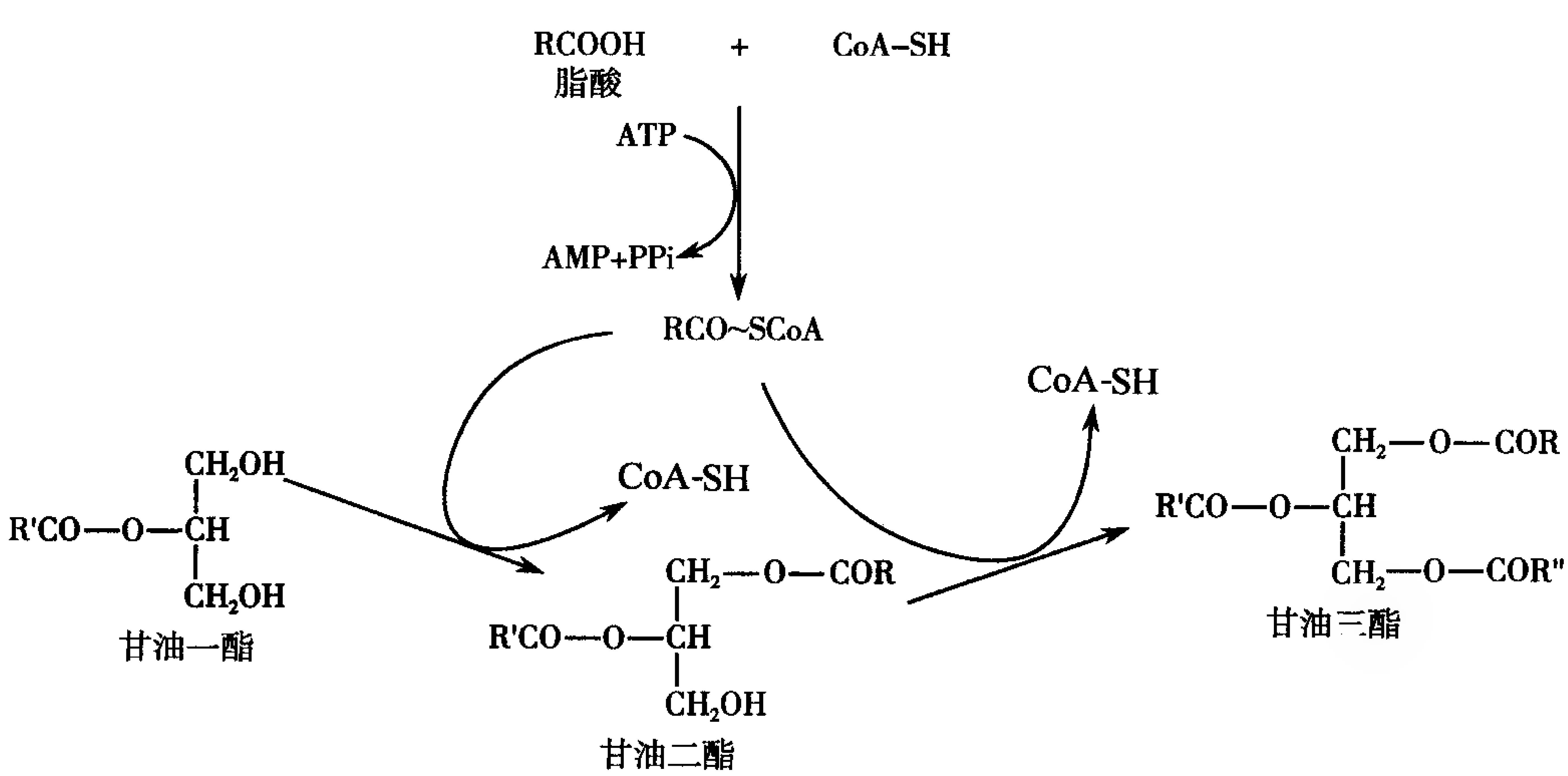
胰腺分泌入十二指肠中消化脂类的酶有胰脂酶（pancreatic lipase）、辅脂酶（colipase）、磷脂酶 A_2（phospholipase A_2）及胆固醇酯酶（cholesteryl esterase）。胰脂酶必须吸附在乳化脂肪微团的脂-水界面上，才能作用于微团内的甘油三酯，特异催化甘油三

酯的1、3位酯键水解，生成2-甘油一酯（2-monoglyceride）及2分子脂酸。辅脂酶是胰脂酶对脂肪消化不可缺少的蛋白质辅因子。辅脂酶的分子量为10kD，在胰腺泡中以酶原形式合成，随胰液分泌入十二指肠后，被胰蛋白酶水解N端的五肽而激活。辅脂酶本身不具脂酶的活性，但它具有与甘油三酯及胰脂酶结合的结构域。通过疏水键与甘油三酯结合，Kd 值为 1×10^{-7} mol/L；通过氢键与胰脂酶结合，结合的分子比为1∶1，Kd 值为 5×10^{-7} mol/L。虽然胰脂酶的作用依赖于胆汁酸盐的存在，但在肠腔内胰脂酶又受胆汁酸盐的抑制。这是因为脂肪乳化，其表面张力升高，反而使胰脂酶不能与微团内的甘油三酯接触；同时在脂-水界面胰脂酶易于变性丧失活性。辅脂酶能与胰脂酶结合同时与甘油三酯结合，使其锚于微团的脂-水界面上，并可防止胰脂酶在脂-水界面的变性，因而能完全解除胆汁酸盐对胰脂酶的抑制、增加胰脂酶活性，促进甘油三酯的水解。

胰磷脂酶 A_2 催化磷脂2位酯键水解，生成脂酸及溶血磷脂；胆固醇酯酶促进胆固醇酯水解生成游离胆固醇及脂酸。甘油三酯及类脂的消化产物甘油一酯、脂酸、胆固醇及溶血磷脂等可与胆汁酸盐乳化成更小的混合微团（mixed micelles）。这种微团体积更小、极性更大、易于穿过小肠黏膜细胞表面的水屏障，为肠黏膜细胞吸收。

二、饮食脂肪在小肠被吸收

脂类消化产物主要在十二指肠下段及空肠上段吸收。大约一半以上的甘油三酯水解至甘油一酯后即被吸收；极少量的甘油三酯经胆汁酸盐乳化后被直接吸收，在肠黏膜细胞内脂酶的作用下，水解为脂酸及甘油，通过门静脉进入血循环。脂酸中以小于12C的中、短链脂酸的吸收较为迅速，吸收后绝大部分通过门静脉入肝。长链脂酸（12～26C）及2-甘油一酯吸收入肠黏膜细胞后，在光面内质网脂酰CoA转移酶（acyl CoA transferase）的催化下，由ATP供给能量，1分子甘油一酯加上2分子脂酰CoA，再合成甘油三酯。后者再与粗面内质网合成的 $apoB_{48}$、apoC、apoAⅠ、apoAⅣ等以及磷脂、胆固醇结合成乳糜微粒（chylomicra，CM），经淋巴进入血液循环。肠黏膜细胞中由甘油一酯合成脂肪的途径称为甘油一酯途径（图5-2）。

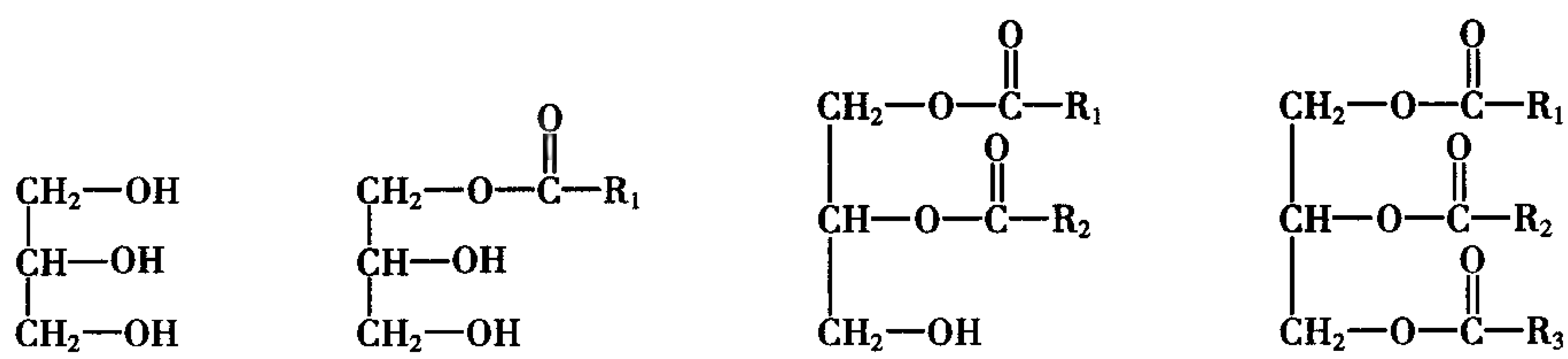


●图5-2 甘油一酯途径

第三节　甘油三酯代谢

一、甘油三酯是甘油的脂酸酯

高等动物的脂肪是甘油三酯的混合物。甘油三酯是非极性、不溶于水的甘油脂酸三酯，其基本结构为甘油的三个羟基分别被相同或不同的脂酸酯化，即甘油三酯是甘油的脂酸酯。将含有同一种脂酸的甘油三酯称为简单甘油三酯（simple triacylglycerol），如三个脂酸均为硬脂酸的甘油三酯被称为三硬脂酸甘油酯（tristearin）；含有两种或三种脂酸的甘油三酯称为混合甘油三酯（mixed triacylglycerol），其组成十分复杂，到目前为止尚未发现天然甘油三酯中脂酸分布的规律。在体内还存在少量的被一个或两个脂酸酯化的甘油酯，分别被称为甘油一酯（monoacylglycerol）和甘油二酯（diacylglycerol）。



甘油　　甘油一酯　　甘油二酯　　甘油三酯

甘油三酯的熔点是由其脂酸组成的种类所决定，它随饱和脂酸的链长和数目的增加而升高。如含有三个硬脂酸的三硬脂酸甘油酯在人正常体温下为固态，而含三个油酸的三油酸甘油酯在体温下却为液态。人肾脂肪囊脂肪因含不饱和脂酸较少，体温下以固态形式存在；植物油因含大量不饱和脂酸，以液态形式存在。

（一）甘油三酯是脂酸的主要储存形式

外源性的食物吸收和内源性合成的脂酸，以游离的形式存在较少，大多数以酯化的形式存在于体内，如甘油三酯、胆固醇酯等。其中，大多数脂酸以酯化的形式存在于甘油三酯之中，与其他脂质成分和蛋白质共同组成脂蛋白进入血液进行运输；在细胞内聚集成脂滴而储存于细胞中。通过酶的水解作用可将甘油三酯中脂酸游离进入代谢过程。也就是说，甘油三酯是脂酸的主要储存形式。

（二）甘油三酯的主要作用是为机体提供能量

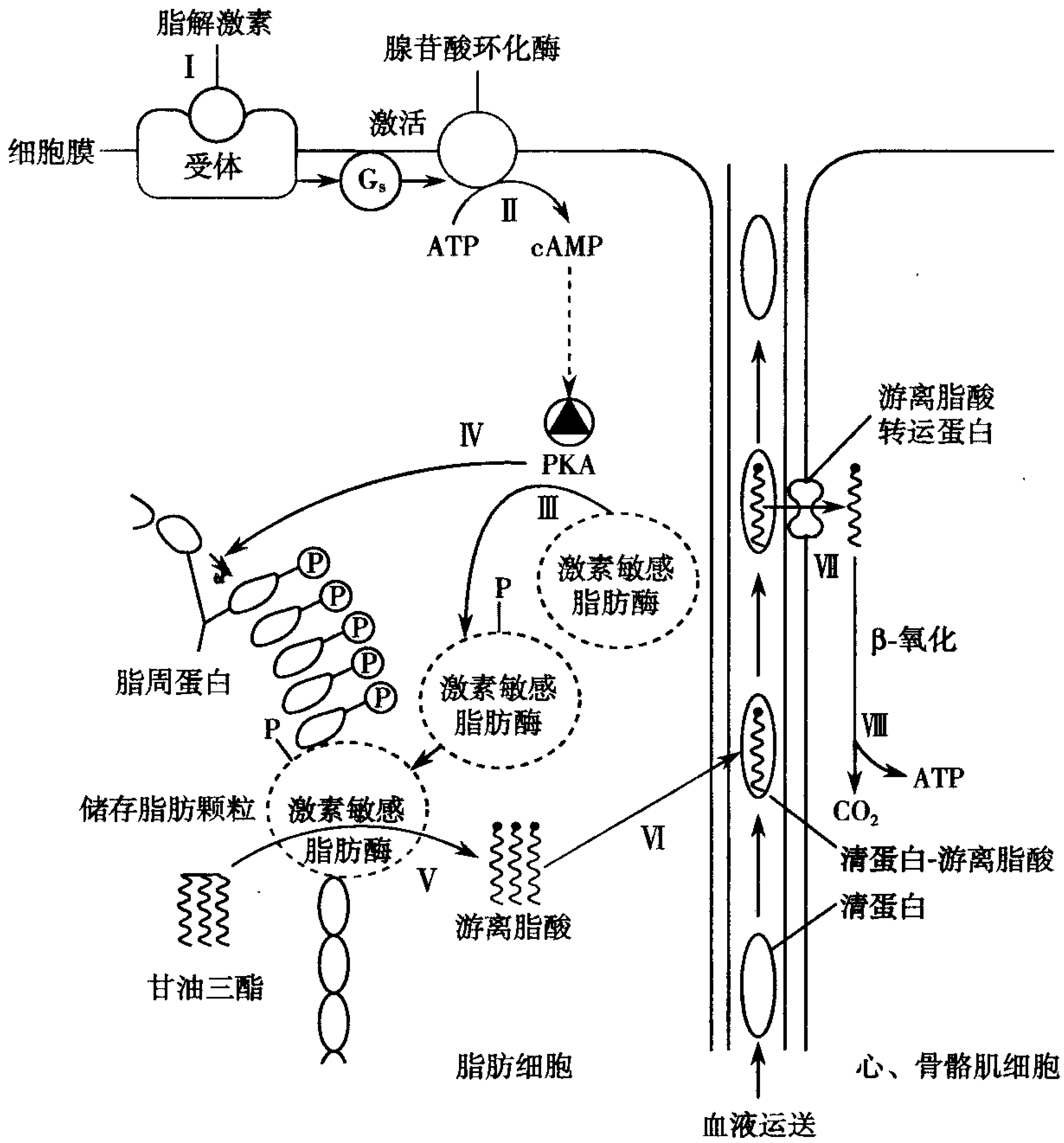
1. 甘油三酯是机体重要的能量来源　甘油三酯富含高度还原碳（highly reduced carbons），在氧化反应代谢过程中可产生大量的能量。1 克甘油三酯彻底氧化可产生 38kJ 能量，而 1 克蛋白质或 1 克碳水化合物只能产生 17kJ 能量。由于甘油三酯为非极性化合物，以无水的形式储存，而糖原（glycogen）在生理条件下结合 2 倍于其重量的水，相同重量的甘油三酯产生的代谢能是糖原的 6 倍。因此，甘油三酯是体内重要的能量来源。

2. 甘油三酯是机体的主要能量储存形式　甘油三酯合成与储存的主要场所是脂肪细胞（adipocyte）。其他类型细胞仅含少量甘油三酯，并以脂滴的形式存在于胞质中。皮下组织和腹腔中富含由脂肪细胞组成的脂肪组织。正常人体内的脂肪量（男性占体重的 21%，女性占体重的 26%）可抵抗 2～3 个月的饥饿。特别是一些恒温动物，如北极熊在夏季摄入大量食物以脂肪形式储备，在寒冷漫长的冬季通过每天氧化 1～1.5kg 储备的脂肪产生能量维持体内的最低代谢和体温。而体内糖原储备量仅能提供少于 1 天的代谢需要；蛋白质作为功能和结构分子，不能无序地进行分解代谢以提供能量。因此，脂肪组织中的甘油三酯是机体的主要能量储存形式。

二、甘油三酯的分解代谢主要是脂酸的氧化

(一) 脂肪动员是甘油三酯分解的起始步骤

脂肪动员(fat mobilization)是指储存在脂肪细胞中的甘油三酯,被脂酶逐步水解为游离脂酸(free fatty acid,FFA)和甘油并释放入血,通过血液运输至其他组织氧化利用的过程(图 5-3)。



●图 5-3 脂肪动员

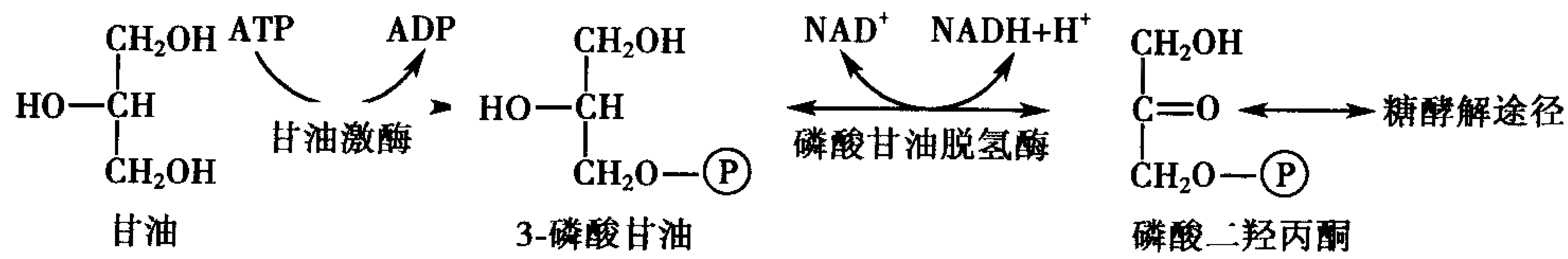
Ⅰ:激素与脂肪细胞膜受体结合;Ⅱ:通过 G 蛋白激活腺苷酸环化酶,进一步活化蛋白激酶 A (protein kinase A,PKA);Ⅲ:PKA 激活 HSL;Ⅳ:PKA 使脂肪细胞中储酯颗粒表面的脂周蛋白分子磷酸化,使 HSL 能直接作用于储酯颗粒中的甘油三酯;Ⅴ:HSL 水解甘油三酯;Ⅵ:FFA 离开脂肪细胞,与血液中的清蛋白结合而运输;Ⅶ:通过游离脂酸转运蛋白将 FFA 转运至心肌、骨骼肌等细胞;Ⅷ:获得 FFA 细胞通过 β-氧化分解脂酸产生 ATP 和 CO_2

当禁食、饥饿或交感神经兴奋时,肾上腺素、去甲肾上腺素、胰高血糖素等分泌增加,作用于脂肪细胞膜表面受体,激活腺苷酸环化酶,促进 cAMP 合成,激活依赖 cAMP 的蛋白激酶,使胞液内甘油三酯脂酶磷酸化而活化。后者使甘油三酯水解成甘油二酯及脂酸。甘油二酯被甘油二酯酶进一步水解成甘油一酯和脂酸,甘油一酯最终被甘油一酯酶水解成甘油和脂酸。甘油三酯脂酶的催化反应是甘油三酯分解的限速步骤,是脂肪动员的限速酶。因其活性受多种激素的调控,故称为激素敏感性甘油三酯脂酶(hormone sensitive triglyceride lipase,HSL)。能促进脂肪动员的激素被称为脂解激素,如肾上腺素、胰高血糖素,促肾上腺皮质激素及促甲状腺激素刺激激素等。能抑制脂肪动员的激素被称为抗脂解激素,如胰岛素、前列腺素 E_2 等。

脂解作用使储存在脂肪细胞中的甘油三酯分解成 FFA 及甘油，然后释放入血。FFA 不溶于水，与清蛋白结合后才能在血液中运输。血浆清蛋白具有结合 FFA 的能力，每分子清蛋白可结合 10 分子 FFA。与清蛋白结合后的 FFA 经血液运至全身各组织，主要由心、肝、骨骼肌等摄取利用。甘油溶于水，直接由血液运送至肝、肾、肠等组织利用。

（二）甘油经糖代谢途径代谢

甘油激酶（glycerokinase）催化甘油磷酸化转变为 3-磷酸甘油；再脱氢生成磷酸二羟丙酮；最后进入糖代谢途径进行分解或异生成糖。肝细胞的甘油激酶活性最高，脂肪动员产生的甘油主要被肝细胞摄取利用，而脂肪、骨骼肌等组织细胞，因甘油激酶活性很低而对甘油的摄取和利用有限。



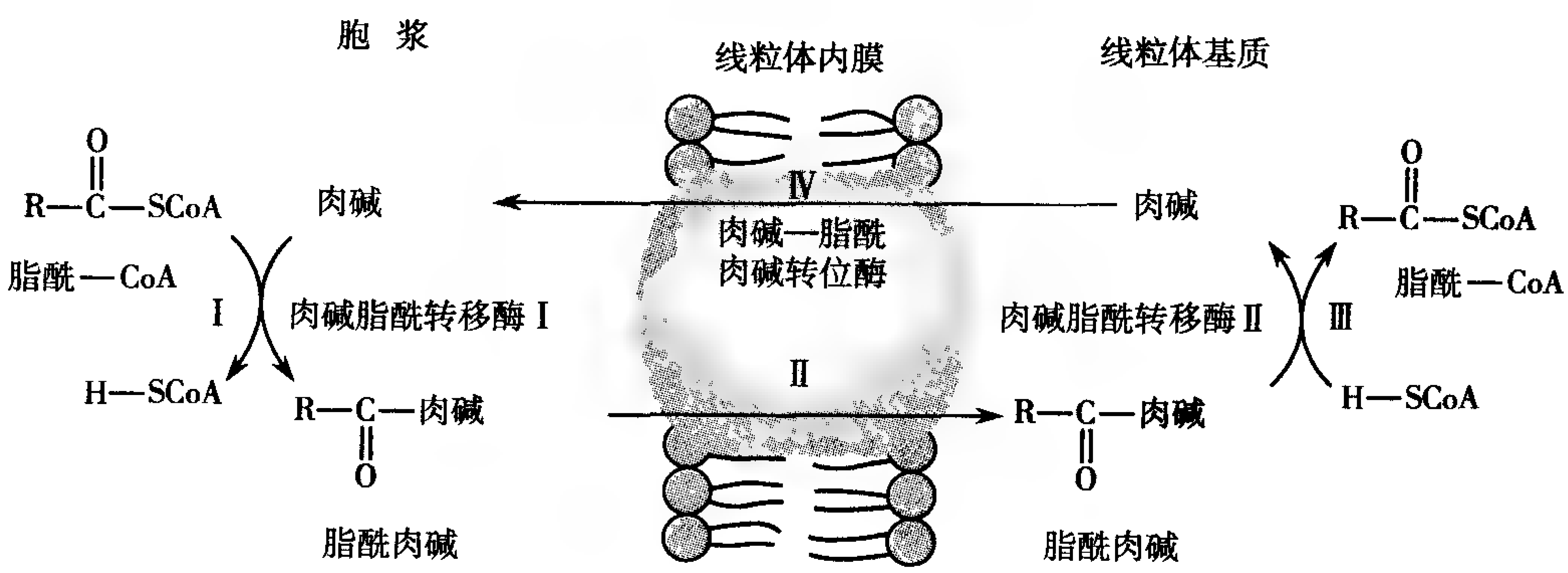
（三）脂酸经β-氧化分解供能

脂酸是人及哺乳类动物的主要能源物质。在 O_2 供给充足的条件下，脂酸可在体内分解成 CO_2 及 H_2O 并释出大量能量，以 ATP 形式供机体利用。除脑组织外，大多数组织均能氧化脂酸，但以肝及肌最活跃。

1. 脂酸的活化形式为脂酰 CoA 脂酸的活化在线粒体外进行，活化后才能进行分解代谢。内质网及线粒体外膜上的脂酰 CoA 合成酶（acyl-CoA synthetase）在 ATP、CoASH、Mg^{2+}存在的条件下，催化脂酸生成脂酰 CoA。

脂酸活化后不仅含有高能硫酯键，而且增加了水溶性，从而提高了脂酸的代谢活性。反应过程中生成的焦磷酸（PPi）立即被细胞内的焦磷酸酶水解，阻止了逆向反应的进行。故 1 分子脂酸活化，实际上消耗了 2 个高能磷酸键。

2. 脂酰 CoA 经肉碱转运进入线粒体 脂酰 CoA 在胞液中生成，而催化其氧化的酶系存在于线粒体的基质内，因此活化的脂酰 CoA 必须进入线粒体内才能进行分解代谢。实验证明，长链脂酰 CoA 不能直接透过线粒体内膜，需通过肉碱[carnitine，L-$(CH_3)_3N^+CH_2CH(OH)CH_2COO^-$，$L$-β 羟-γ-三甲氨基丁酸] 的转运才能进入线粒体基质（图 5-4）。



●图 5-4 长链脂酰 CoA 进入线粒体

Ⅰ：线粒体外膜存在肉碱脂酰转移酶Ⅰ，催化胞浆中长链脂酰 CoA 与肉碱合成脂酰肉碱（acyl carnitine）；Ⅱ：脂酰肉碱在线粒体内膜的肉碱—脂酰肉碱转位酶（carnitine-acylcarnitine translocase）的作用下，通过内膜进入线粒体基质。此转位酶实际上是线粒体内膜转运肉碱及脂酰肉碱的载体。它在转运 1 分子脂酰肉碱进入线粒体基质的同时，将 1 分子肉碱转运至线粒体内膜外膜间腔；Ⅲ：进入线粒体内的脂酰肉碱，则在位于线粒体内膜内侧面的肉碱脂酰转移酶Ⅱ的作用下，转变为脂酰 CoA 并释出肉碱；Ⅳ：在肉碱—脂酰肉碱转位酶的作用下，肉碱从线粒体基质转运至胞浆

脂酰 CoA 进入线粒体是脂酸 β-氧化（beta-oxidation）的主要限速步骤，肉碱脂酰转移酶Ⅰ（carnitine acyl transferase Ⅰ）是脂酸 β-氧化的限速酶。当饥饿、高脂低糖膳食或糖尿病时，机体不能利用糖，需脂酸供能，这时肉碱脂酰转移酶Ⅰ活性增加，脂酸氧化增强。相反，饱食后，脂肪合成及丙二酰 CoA 增加，后者抑制肉碱脂酰转移酶Ⅰ活性，因而脂酸的氧化被抑制。

脂酸β-氧化的实验研究

1904 年 F. Knoop 用不能被机体分解的苯基标记脂酸的 ω 甲基，以此喂养犬或兔，发现如喂标记偶数碳的脂酸，尿中排出的代谢物均为苯乙酸（$C_6H_5CH_2COOH$），如喂标记奇数碳的脂酸则尿中发现的代谢物均为苯甲酸（C_6H_5COOH）。据此他提出脂酸在体内的氧化分解是从羧基端 β-碳原子开始，每次断裂 2 个碳原子的“β-氧化学说”，这是同位素示踪技术未建立前颇有创造性的实验。以后用酶学及同位素标记等技术证明，他的设想是正确的。20 世纪 50 年代已基本阐明脂酸 β-氧化的过程。

3. 脂酸的 β-氧化的最终产物主要是乙酰 CoA 脂酰 CoA 进入线粒体基质后，在线粒体基质中疏松结合的脂酸 β-氧化多酶复合体的有序催化下，从脂酰基的 β-碳原子开始，进行脱氢、加水、再脱氢及硫解等四步连续反应，脂酰基断裂生成 1 分子比原来少 2 个碳原子的脂酰 CoA 及 1 分子乙酰 CoA（图 5-5）。脂酸 β-氧化的过程如下：

（1）脱氢：在脂酰 CoA 脱氢酶的催化下，脂酰 CoA 的 α、β 碳原子各脱下一氢原子，生成反 Δ^2 烯酰 CoA。脱下的 2H 由 FAD 接受生成 $FADH_2$。

（2）加水：反 Δ^2 烯酰 CoA 在 Δ^2 烯酰水化酶的催化下，加水生成 *L*(＋)-β-羟脂酰 CoA。

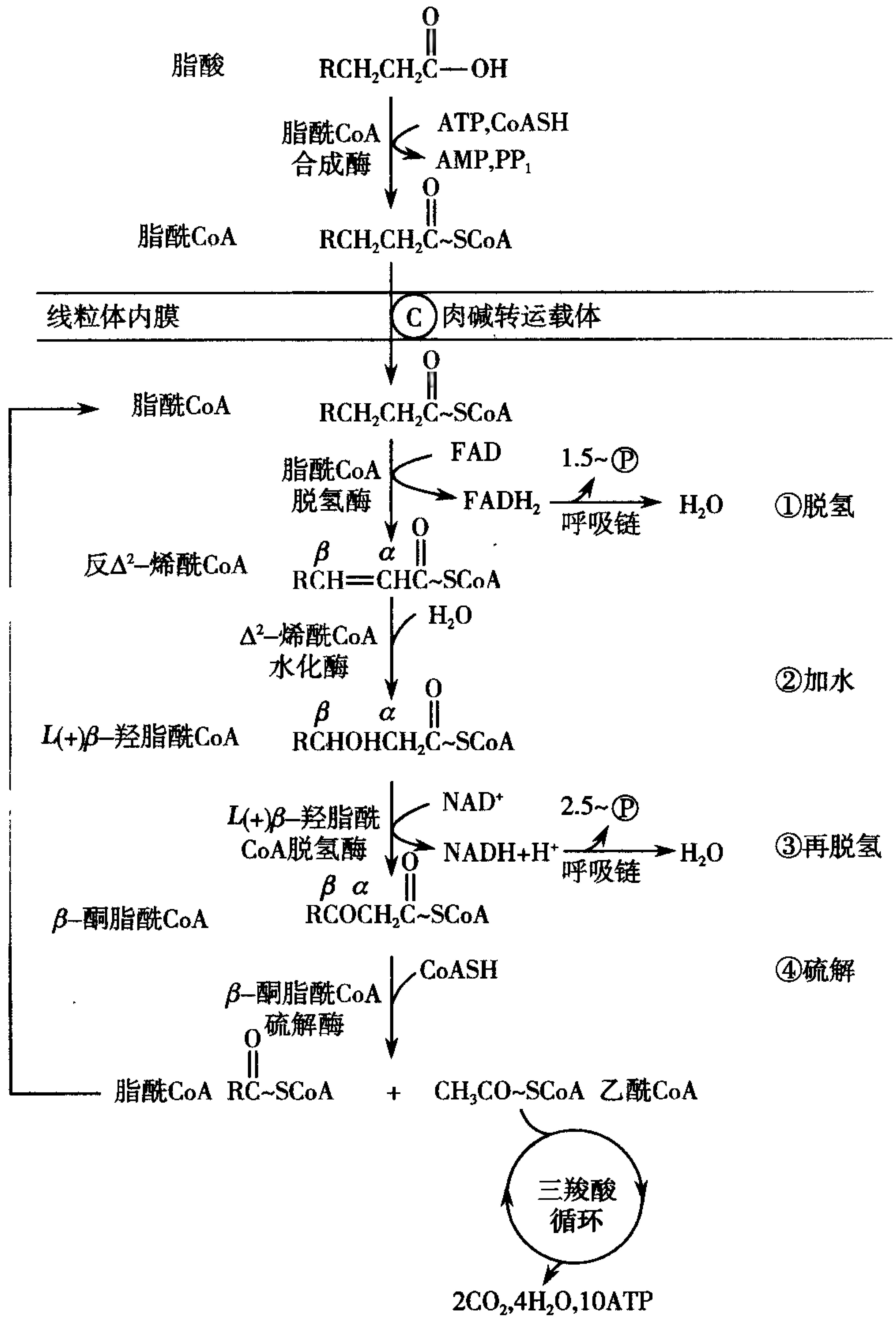
（3）再脱氢：*L*(＋)-β-羟脂酰 CoA 在 β-羟脂酰 CoA 脱氢酶的催化下，脱下 2H 生成 β-酮脂酰 CoA，脱下的 2H 由 NAD^+ 接受，生成 $NADH+H^+$。

（4）硫解：β-酮脂酰 CoA 在 β 酮脂酰 CoA 硫解酶催化下，加 CoASH 使碳链断裂，生成 1 分子乙酰 CoA 和少 2 个碳原子的脂酰 CoA。

通过一次 β-氧化，可产生 1 分子乙酰 CoA、1 分子 $FADH_2$、1 分子 $NADH+H^+$ 和比 β-氧化前少 2 个碳原子的脂酰 CoA。后者可再进行脱氢、加水、再脱氢及硫解反应。如此反复进行，直至生成丁酰 CoA，再进行一次 β-氧化生成 2 分子乙酰 CoA，完成脂酸的 β-氧化。

脂酸经 β-氧化后生成大量的乙酰 CoA，一部分在线粒体内通过三羧酸循环彻底氧化，一部分在线粒体中缩合生成酮体，通过血液运送至肝外组织氧化利用。

4. 脂酸氧化是体内能量的重要来源 以软脂酸为例，进行 7 次 β-氧化，生成 7 分子 $FADH_2$、7 分子 $NADH+H^+$ 及 8 分子乙酰 CoA。1 分子 $FADH_2$ 通过呼吸链氧化产生 1.5 分子 ATP，1 分子 $NADH+H^+$ 氧化产生 2.5 分子 ATP，1 分子乙酰 CoA 通过三羧酸循环氧化产生 10 分子 ATP。因此 1 分子软脂酸彻底氧化共生成$(7\times1.5)+(7\times2.5)+(8\times10)=108$ 个 ATP。减去脂酸活化时消耗的 2 个高能磷酸键（相当于 2 个 ATP），净生成 106 分子 ATP 或 $106\times30.5=3233$kJ/mol。1mol 软脂酸在体外彻底氧化成 CO_2 及 H_2O 时的自由能为 9791kJ，故软脂酸在体内氧化生成的能量 33％储存在 ATP 的高能磷酸键中，其余以热能释放。



●图 5-5　脂酸的 β-氧化

由此可见，脂酸和葡萄糖一样都是机体的重要能源物质。若以重量计算，1mol 脂酸产生的能量（106ATP）比 1mol 葡萄糖产生的能量（32ATP）多，但其能量的利用效率相当，均为 33%。

（四）脂酸的其他氧化方式

1. 不饱和脂酸的氧化　机体中脂酸约一半以上是不饱和脂酸。不饱和脂酸与饱和脂酸一样，在胞质中活化、通过肉碱转运进入线粒体后进行 β-氧化。但不饱和脂酸在氧化过程中产生顺式 Δ^2 烯酰 CoA，β-氧化即不能继续进行，需经线粒体特异的 Δ^3 顺→Δ^2 反烯酰 CoA 异构酶（Δ^3-cis→Δ^2-trans enoyl-CoA isomerase）的催化，将 Δ^3 顺式转变为 β-氧化酶系所需的 Δ^2 反式构型，β-氧化才能继续进行。如不饱和脂酸经 β-氧化后生成顺式 Δ^2 脂烯酰 CoA，则水化生成 *D*(−)-β-羟脂酰 CoA。后者需经线粒体的 *D*(−)-β-羟脂酰 CoA 表构酶（epimerase）催化，将右旋异构体转变为 β-氧化酶系所需的 *L*(+)-β-羟脂酰 CoA 左旋异构体，才能继续进行 β-氧化。

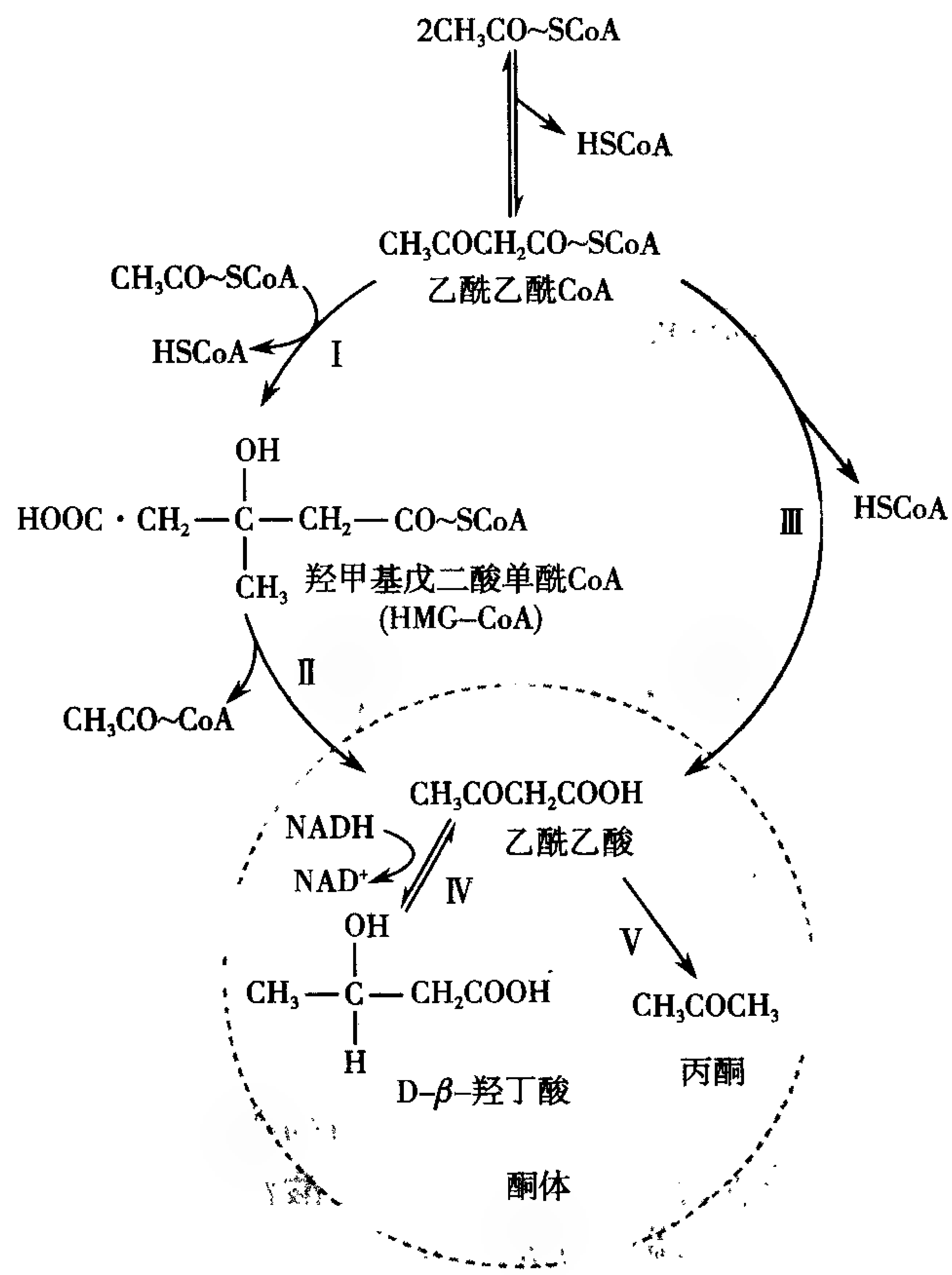
2. 过氧化酶体的 β-氧化　脂酸的氧化除线粒体外，还可通过过氧化酶体（peroxi-

some）中脂酸β-氧化酶系的作用。它能使极长链脂酸（>22 碳）氧化成较短链脂酸，再进入线粒体内分解氧化。其反应与线粒体β-氧化基本一致，不同的是由 FAD 为辅基的脂酸氧化酶催化长链脂酸，脱下的氢与 O_2 结合生成 H_2O_2，而不与呼吸链偶联产生 ATP，产生的 H_2O_2 被过氧化氢酶分解。过氧化酶体脂酸氧化途径的生理意义主要是使不能进入线粒体的长链脂酸 CoA 先氧化成较短链脂酸 CoA（≤8C），再进入线粒体氧化。

3. 奇数碳原子脂酸的氧化　人体自体合成和摄入的脂酸绝大多数为偶碳脂酸，但一些植物和海洋生物可合成奇碳脂酸。奇碳脂酸摄入后，经脂酸β-氧化后除生成乙酰 CoA 外，还生成 1 分子丙酰 CoA。丙酰 CoA 经β-羧化酶及异构酶的作用可转变为琥珀酰 CoA，进入三羧酸循环而被氧化。此外，支链氨基酸氧化亦可产生丙酰 CoA。

（五）酮体的生成及利用

在骨骼肌、心肌等肝外组织线粒体内，脂酸β-氧化产生的乙酰 CoA 直接进入三羧酸循环彻底氧化供能。而肝细胞产生的大量乙酰 CoA 除通过氧化生成 ATP 供能外，还在线粒体内转化为被称为酮体（ketone bodies）的化合物。酮体包括乙酰乙酸（acetoacetate）、β-羟丁酸（β-hydroxybutyrate）及丙酮（acetone），是脂酸在肝细胞分解氧化时产生的特有中间代谢物。



●图 5-6　酮体在肝细胞中的生成

Ⅰ：HMG-CoA 合成酶；Ⅱ：HMG-CoA 裂解酶；Ⅲ：乙酰乙酰 CoA 脱酰酶；Ⅴ：β-羟丁酸脱氢酶；Ⅴ：乙酰乙酰脱羧酶

1. 酮体在肝细胞中生成　酮体的合成原料是脂酸在肝细胞线粒体中经β-氧化生成的大量乙酰 CoA，合成部位为肝细胞线粒体，其过程分三步进行。

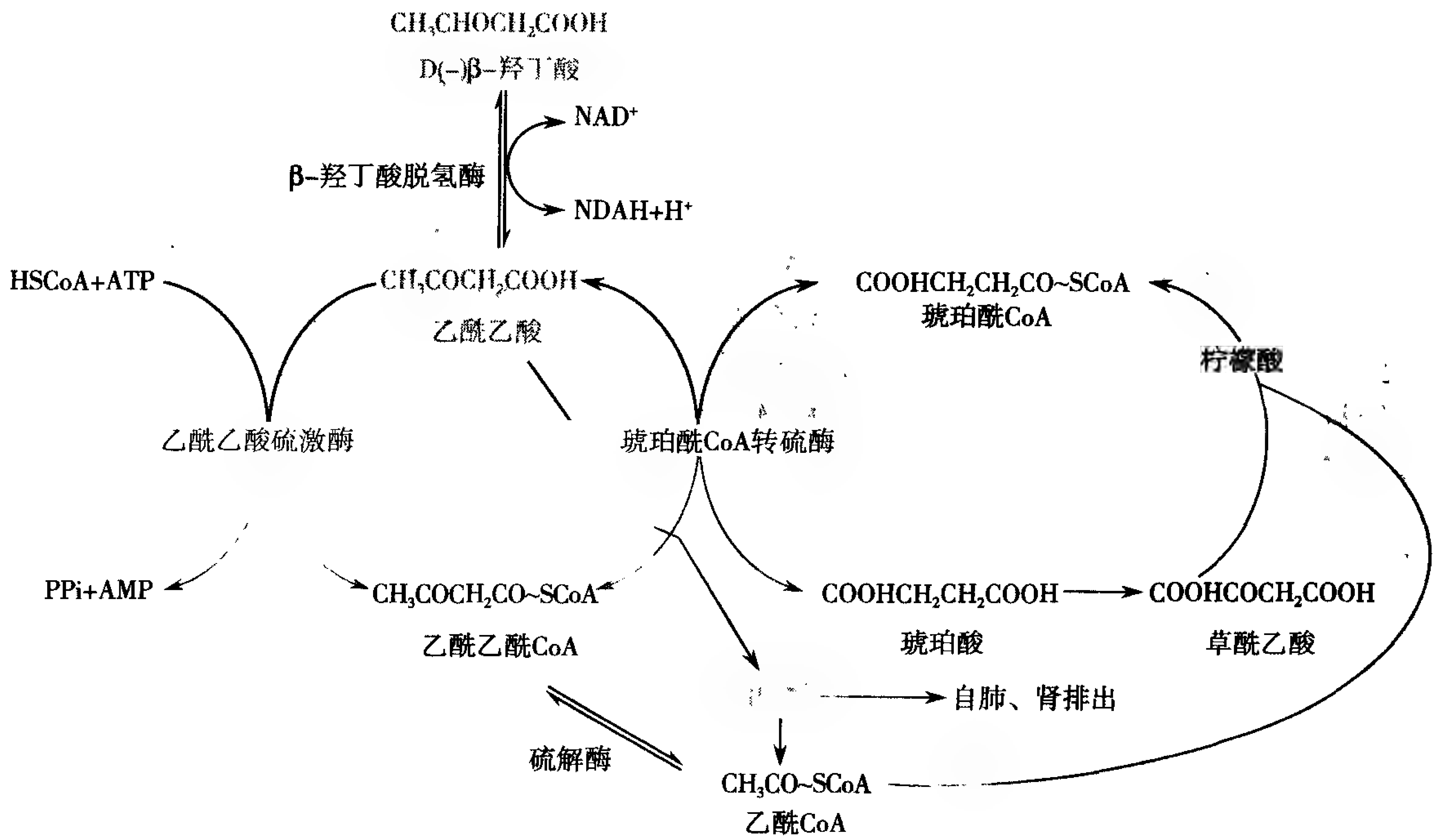
（1）2 分子乙酰 CoA 在肝细胞线粒体乙酰乙酰 CoA 硫解酶（thiolase）的作用下，缩合成乙酰乙酰 CoA，并释出 1 分子 CoASH。

（2）乙酰乙酰 CoA 在羟甲基戊二酸单酰 CoA（3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA，HMG CoA）合成酶的催化下，再与 1 分子乙酰 CoA 缩合生成 HMG CoA，并释出 1 分子 CoASH。

（3）HMG CoA 在 HMG CoA 裂解酶的作用下，裂解生成乙酰乙酸和乙酰 CoA。乙酰乙酸在线粒体内膜β-羟丁酸脱氢酶的催化下，被还原成β-羟丁酸，所需的氢由 NADH 提供，还原的速度由 $NADH/NAD^+$ 的比值决定。部分乙酰乙酸可在乙酰乙酰脱羧酶的催化下脱羧而成丙酮（图 5-6）。

肝细胞线粒体内含有各种合成酮体的酶类，尤其是 HMG CoA 合成酶，因此生成酮体是肝细胞特有的功能。但是肝细胞氧化酮体的酶活性很低，因此肝细胞不能氧化酮体。肝细胞产生的酮体，透过细胞膜进入血液运输到肝外组织进一步分解氧化。

2. 酮体在肝外组织利用　肝外许多组织具有活性很强的利用酮体的酶，可将酮体裂解成乙酰 CoA，并通过三羧酸循环彻底分解氧化供能（图 5-7）。



●图 5-7　酮体的氧化

心、肾、脑及骨骼肌的线粒体具有较高的琥珀酰 CoA 转硫酶活性。在有琥珀酰 CoA 存在时，此酶能使乙酰乙酸活化，生成乙酰乙酰 CoA。后者在乙酰乙酰 CoA 硫解酶的作用下硫解，生成 2 分子乙酰 CoA 后可进入三羧酸循环彻底氧化。

肾、心和脑的线粒体中还存在乙酰乙酰硫激酶，可直接活化乙酰乙酸生成乙酰乙酰 CoA，后者在硫解酶的作用下硫解为 2 分子乙酰 CoA。

β-羟丁酸在 β-羟丁酸脱氢酶的催化下，脱氢生成乙酰乙酸；然后再转变成乙酰 CoA 而被氧化。正常情况下，丙酮量少，易发挥，经肺排出。部分丙酮可在一系列酶作用下转变为丙酮酸或乳酸，进而异生成糖。这是脂酸的碳原子转变成糖的一个途径。

总之，肝是生成酮体的器官，但不能利用酮体；肝外组织不能生成酮体，却可以利用酮体。

3. 酮体生成的生理意义　酮体是脂酸在肝内正常的中间代谢产物，是肝输出能源的一种形式。酮体溶于水，分子小，能通过血脑屏障及肌肉的毛细血管壁，是肌肉尤其是脑组织的重要能源。脑组织不能氧化脂酸，却能利用酮体。长期饥饿、糖供应不足时酮体可代替葡萄糖成为脑、肌等组织的主要能源。

正常情况下，血中仅含有少量酮体，为 0.03～0.5mmol/L（0.3～5mg/dl）。在饥饿、高脂低糖膳食及糖尿病时，脂酸动员加强，酮体生成增加。尤其在未控制糖尿病患者，血液酮体的含量可高出正常情况的数十倍，这时丙酮约占酮体总量的一半，通过呼吸排出体外。酮体生成超过肝外组织利用的能力，引起血中酮体升高，可导致酮症酸中毒，并随尿排出，引起酮尿。

4. 酮体生成的调节

（1）饱食及饥饿的影响：饱食后，胰岛素分泌增加，脂解作用抑制、脂肪动员减少，进入肝的脂酸减少，因而酮体生成减少。饥饿时，胰高血糖素等脂解激素分泌增多，脂酸动员加强，血中游离脂酸浓度升高而使肝摄取游离脂酸增多，有利于脂酸 β-氧化及酮体生成。

（2）肝细胞糖原含量及代谢的影响：进入肝细胞的游离脂酸主要有两条去路，一是在胞液中酯化合成甘油三酯及磷脂；一是进入线粒体内进行β-氧化，生成乙酰 CoA 及酮体。饱食及糖供给充足时，肝糖原丰富，糖代谢旺盛，此时进入肝细胞的脂酸主要酯化 3-磷酸甘油反应生成甘油三酯及磷脂。饥饿或糖供给不足时，糖代谢减弱，3-磷酸甘油及 ATP 不足，脂酸酯化减少，主要进入线粒体进行β氧化，酮体生成增多。

（3）丙二酰 CoA 抑制脂酰 CoA 进入线粒体：饱食后糖代谢正常进行时所生成的乙酰 CoA 及柠檬酸能变构激活乙酰 CoA 羧化酶，促进丙二酰 CoA 的合成。后者能竞争性抑制肉碱脂酰转移酶Ⅰ，从而阻止脂酰 CoA 进入线粒体内进行β-氧化。

从上述可见，脂酸的氧化及酮体生成受多个环节的影响。

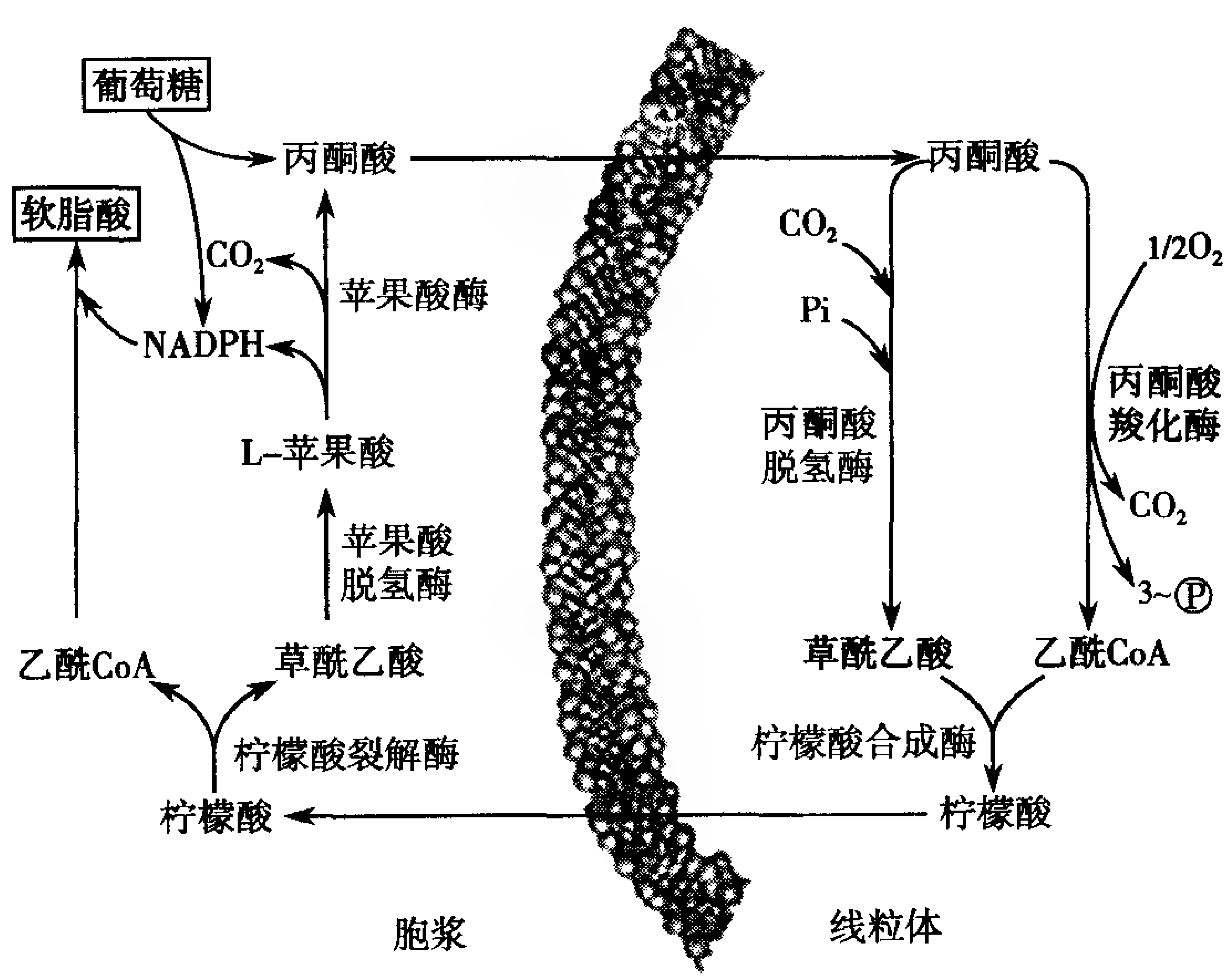
三、脂酸在脂酸合成酶系的催化下合成

脂酸的合成反应不是脂酸β-氧化的逆过程。β-氧化的逆反应只参与脂酸碳链的延长。

（一）软脂酸的合成

1. 合成部位 脂酸合成酶系存在于肝、肾、脑、肺、乳腺及脂肪等组织，位于线粒体外胞液中。肝是人体合成脂酸的主要场所，其合成能力较脂肪组织大 8～9 倍。脂肪组织是储存脂肪的场所，它本身可以以葡萄糖为原料合成脂酸及脂肪，但主要摄取并储存由小肠吸收的食物脂酸以及肝合成的脂酸。

2. 合成原料 乙酰 CoA 是合成脂酸的主要原料，主要来自葡萄糖。细胞内的乙酰 CoA 全部在线粒体内产生，而合成脂酸的酶系存在于胞液。线粒体内的乙酰 CoA 必须进入胞液才能成为脂酸的合成原料。乙酰 CoA 不能自由透过线粒体内膜，主要通过柠檬酸-丙酮酸循环（citrate pyruvate cycle）完成（图 5-8）。



●图 5-8 柠檬酸-丙酮酸循环

乙酰 CoA 首先在线粒体内与草酰乙酸缩合生成柠檬酸，通过线粒体内膜上的载体转运进入胞液；胞液中 ATP 柠檬酸裂解酶使柠檬酸裂解释出乙酰 CoA 及草酰乙酰。进入胞液的乙酰 CoA 可用以合成脂酸，而草酰乙酸则在苹果酸脱氢酶的作用下，还原成苹果酸。苹果酸也可在苹果酸酶的作用下分解为丙酮酸，再转运入线粒体，最终均形成线粒体内的草酰乙酸，再参与转运乙酰 CoA

脂酸的合成除需乙酰 CoA 外，还需 ATP、NADPH、HCO_3^-（CO_2）及 Mn^{2+} 等。脂酸的合成是还原性合成，所需之氢全部由 NADPH 提供。NADPH 主要来自磷酸戊糖通路。胞液中异柠檬酸脱氢酶及苹果酸酶（两者均以 NADP 为辅酶）催化的反应也可提供少量的 NADPH（图 5-8）。

3. 脂酸合成酶系及反应过程

（1）丙二酰 CoA 的合成：乙酰 CoA 羧化成丙二酰 CoA 是脂酸合成的第一步反应。此反应由乙酰 CoA 羧化酶（acetyl CoA carboxylase）所催化，这是一种变构酶，是脂酸合成的限速酶。该酶存在于胞液中，辅基为生物素，Mn^{2+} 为激活剂。有两种存在形式，一是无活性的单体，分子量约为 4 万，另一是有活性的多聚体，分子量为 60～80 万，通常由 10～20 个单体构成，呈线状排列，催化活性增加 10～20 倍。柠檬酸、异柠檬酸可使此酶发生变构，由无活性的单体聚合成有活性的多聚体，而软脂酰 CoA 及其他长链脂酰 CoA 则能使多聚体解聚成单体，抑制乙酰 CoA 羧化酶的催化活性。

已证明乙酰 CoA 羧化酶也受磷酸化、去磷酸化调节。此酶可被一种依赖于 AMP（而不是 cAMP）的蛋白激酶磷酸化（79，1200 及 1215 位丝氨酸残基磷酸化）而失活。胰高血糖素能激活此激酶而抑制乙酰 CoA 羧化酶的活性，而胰岛素则能通过蛋白质磷酸酶的作用使磷酸化的乙酰 CoA 羧化酶脱磷酸而恢复活性。高糖膳食可促进酶蛋白的合成，因而可促进乙酰 CoA 的羧化反应。

生物素是乙酰 CoA 羧化酶的辅基，在羧化反应中起着转移羧基的作用，其反应过程如下：

$$\text{酶-生物素} + HCO_3^- + ATP \longleftrightarrow \text{酶-生物素-}CO_2 + ADP + Pi$$

$$\text{酶-生物素-}CO_2 + \text{乙酰 CoA} \longrightarrow \text{酶-生物素} + \text{丙二酰 CoA}$$

$$\text{总反应：} ATP + HCO_3^- + \text{乙酰 CoA} \longrightarrow \text{丙二酰 CoA} + ADP + Pi$$

（2）脂酸合成：从乙酰 CoA 及丙二酰 CoA 合成长链脂酸，实际上是一个重复加成反应过程，每次延长 2 个碳原子。16 碳软脂酸的生成，需经过连续 7 次重复加成反应。各种生物合成脂酸的过程基本相似，大肠杆菌中，这种加成过程是由 7 种酶蛋白聚合在一起构成的多酶体系所催化的；而在高等动物，这 7 种酶活性都在一条多肽链上，属多功能酶，由一个基因所编码。

大肠杆菌的脂酸合成酶系中，有酰基载体蛋白（acyl carrier protein，ACP），其辅基与 CoA-SH 相同，是脂酸合成过程中脂酰基的载体，脂酸合成的各步反应均在 ACP 的辅基上进行。

哺乳类动物中，7 种酶活性均在分子量为 250kD 的一条多肽链上。具有活性的酶是由两个完全相同的多肽链（亚基）首尾相连组成的二聚体，此二聚体解聚则活性丧失。每一亚基的酮脂酰合成酶结构域中的一半胱氨酸残基的 SH 基能与脂酰基相连，用 E_1-半胱 SH 表示。每一亚基均有一 ACP 结构域，其丝氨酸残基连有 4′磷酸泛酰氨基乙硫醇，作为脂酸合成过程中脂酰基的载体，可与脂酰基相连，用 E_2-泛-SH 表示。

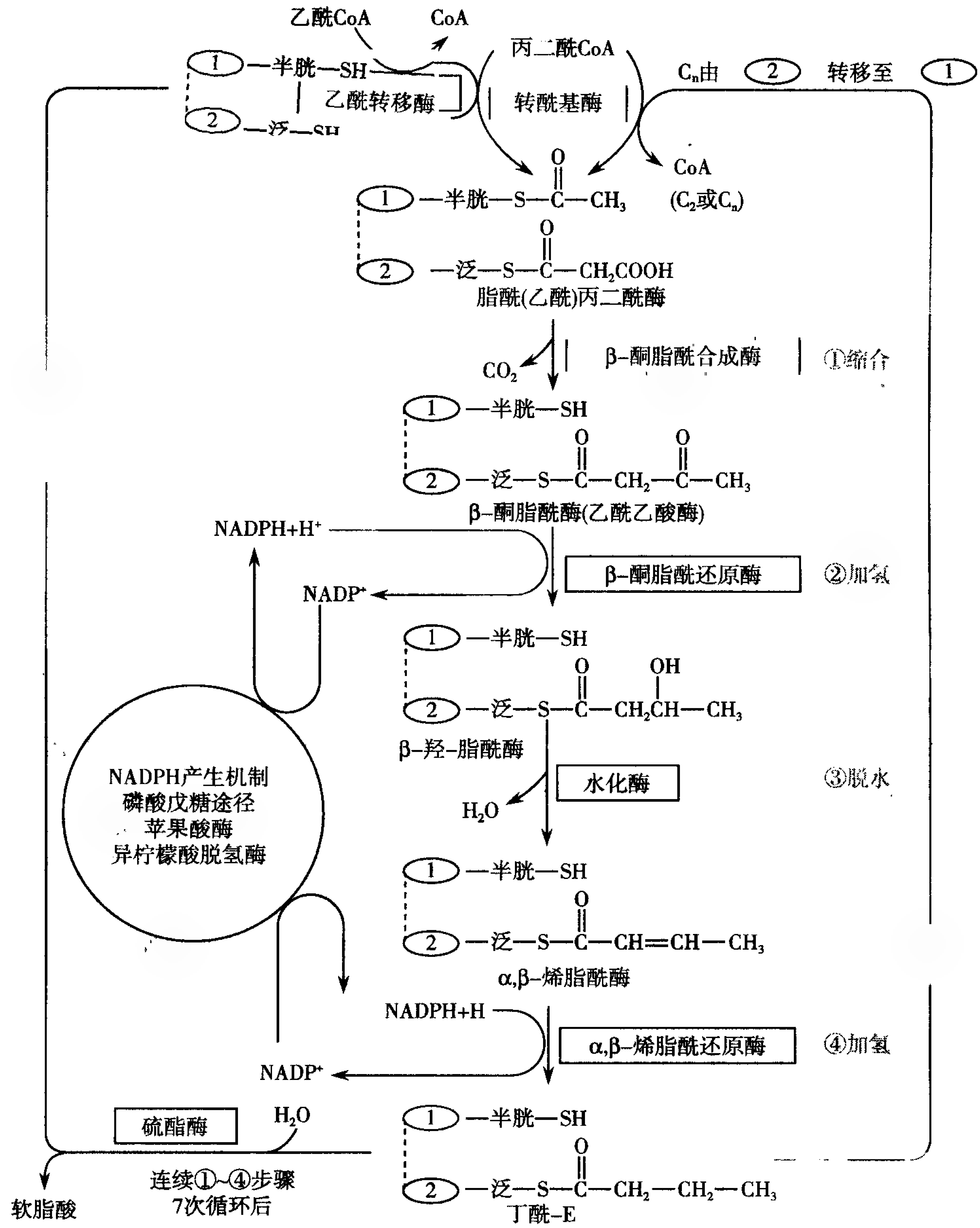
软脂酸合成的总反应式为：

$$CH_3COSCoA + 7HOOCCH_2COSCoA + 14NADPH + 14H^+ \longrightarrow$$
$$CH_3(CH_2)_{14}COOH + 7CO_2 + 6H_2O + 8HSCoA + 14NADP^+$$

脂酸的合成步骤见图 5-9。

（二）脂酸碳链的加长

脂酸合成酶催化合成的脂酸是软脂酸。更长碳链的脂酸则是对软脂酸的加工，使其碳链延长。碳链延长在肝细胞的内质网或线粒体中进行。



●图 5-9 软脂酸的生物合成

丁酰-E 是脂酸合成酶催化合成的第一轮产物。通过这一轮反应，即酰基转移、缩合、还原、脱水、再还原等步骤，碳原子由 2 增加至 4 个。然后丁酰由 E_2-泛-SH 转移至 E_1-半胱-SH 上，E_2-泛-SH（即 ACP 的 SH）基又可与一新的丙二酰基结合，进行缩合、还原、脱水、再还原等步骤的第二轮反应。经过 7 次循环之后，生成 16 个碳原子的软脂酰-E_2，然后经硫酯酶的水解，即生成终产物游离的软脂酸

1. 脂酸碳链在内质网中的延长 主要通过内质网脂酸碳链的延长酶体系使软脂酸碳链延长。以丙二酰 CoA 为二碳单位的供给体，由 NADPH＋H^+ 供氢，通过缩合、加氢、脱水及再加氢等反应，每一轮可增加 2 个碳原子，反复进行可使碳链逐步延长。其合成过程与软脂酸的合成相似，但脂酰基连在 CoASH 上进行反应，而不是以 ACP 为载体。一般可将脂酸碳链延长至二十四碳，但以十八碳的硬脂酸为最多。

2. 脂酸碳链在线粒体中的延长 在线粒体脂酸延长酶体系的催化下，软脂酰 CoA 与乙酰 CoA 缩合，生成 β-酮硬脂酰 CoA，然后由 NADPH＋H^+ 供氢，还原为 β-羟硬脂酰

CoA，又脱水生成 α，β-硬脂烯酰 CoA，再由 $NADPH+H^+$ 供氢，即还原为硬脂酰 CoA，其过程与 β-氧化的逆反应基本相似，但需 α，β-烯酰还原酶及 $NADPH+H^+$。通过此种方式，每一轮反应可加上 2 个碳原子，一般可延长脂酸碳链至 24 或 26 个碳原子，仍以硬脂酸最多。

（三）不饱和脂酸的合成

人体含有的不饱和脂酸主要有软油酸（16∶1，Δ^9）、油酸（18∶1，Δ^9）、亚油酸（18∶2，$\Delta^{9,12}$），α-亚麻酸（18∶3，$\Delta^{9,12,15}$）及花生四烯酸（20∶4，$\Delta^{5,8,11,14}$）等。动物因含有 Δ^4，Δ^5，Δ^8 及 Δ^9 去饱和酶（desaturase），因此软油酸和油酸这两种单不饱和脂酸可在人体内合成；由于缺乏 Δ^9 以上的去饱和酶不能合成后三种多不饱和脂酸，必须通过摄入含 Δ^9，Δ^{12} 及 Δ^{15} 去饱和酶的植物获得。

（四）脂酸合成的调节

1. 代谢物的调节作用 进食高脂食物以后或饥饿脂肪动员加强时，肝细胞内脂酰 CoA 增多，可变构抑制乙酰 CoA 羧化酶，从而抑制体内脂酸的合成；进食糖类而糖代谢加强，NADPH 及乙酰 CoA 供应增多，有利于脂酸的合成，同时糖代谢加强使细胞内 ATP 增多，可抑制异柠檬酸脱氢酶，造成异柠檬酸及柠檬酸堆积，透出线粒体，可变构激活乙酰 CoA 羧化酶，使脂酸合成增加。此外，大量进食糖类也能增强各种合成脂肪有关的酶活性从而使脂肪合成增加。

2. 激素的调节作用 胰岛素是调节脂肪合成的主要激素。它能诱导乙酰 CoA 羧化酶、脂酸合成酶、ATP-柠檬酸裂解酶等的合成，从而促进脂酸合成。同时，由于胰岛素还能促进脂酸合成磷脂酸，因此还增加脂肪的合成。

胰高血糖素通过增加蛋白激酶 A 活性使乙酰 CoA 羧化酶磷酸化而降低其活性，故能抑制脂酸的合成，此外也抑制甘油三酯的合成，甚至减少肝脂肪向血中释放。肾上腺素、生长素也能抑制乙酰 CoA 羧化酶，从而影响脂酸合成。

胰岛素能加强脂肪组织的脂蛋白脂酶（lipoprotein lipase）活性，促使脂酸进入脂肪组织，加速合成脂肪而贮存，故易导致肥胖。

四、甘油和脂酸合成甘油三酯

（一）合成部位

肝、脂肪组织及小肠是合成甘油三酯的主要场所，以肝的合成能力最强。

肝细胞能合成脂肪，但不能储存脂肪。甘油三酯在肝内质网合成后，与 $apoB_{100}$、apoC 等载脂蛋白和磷脂、胆固醇等结合生成极低密度脂蛋白（very low density lipoprotein，VLDL），由肝细胞分泌入血而运输至肝外组织。因营养不良、中毒、必需脂酸缺乏、胆碱缺乏或蛋白质缺乏，肝细胞合成的甘油三酯不能形成 VLDL 分泌入血，则聚集以脂滴形式存在于肝细胞质中，形成脂肪肝。

脂肪组织是机体合成脂肪的另一重要组织。主要以葡萄糖为原料合成脂肪。也可利用从食物脂肪而来的乳糜微粒（CM）或 VLDL 中的脂酸合成脂肪。

小肠黏膜细胞则主要利用脂肪消化产物再合成脂肪，以乳糜微粒形式经淋巴进入血液循环，但不储存脂肪。

（二）合成原料

甘油和脂酸是合成甘油三酯的基本原料，主要由葡萄糖代谢提供。人及动物即使完全不摄取脂肪，亦可由糖大量合成脂肪。食物脂肪消化吸收后以 CM 的形式进入血液循环，

运送至脂肪组织或肝，其脂酸亦可用于脂肪的合成。

（三）合成基本过程

1. 甘油一酯途径　是小肠黏膜细胞合成甘油三酯的主要途径，即利用消化吸收的甘油一酯及脂酸再合成甘油三酯（见消化吸收一节）。

2. 甘油二酯途径　是肝细胞及脂肪细胞合成甘油三酯的主要途径。葡萄糖经糖酵解途径生成3-磷酸甘油，在脂酰CoA转移酶的作用下，依次加上2分子脂酰CoA生成磷脂酸（phosphatidic acid）。后者在磷脂酸磷酸酶的作用下，水解脱去磷酸生成1,2-甘油二酯，然后在脂酰CoA转移酶的催化下，再加上1分子脂酰基生成甘油三酯。

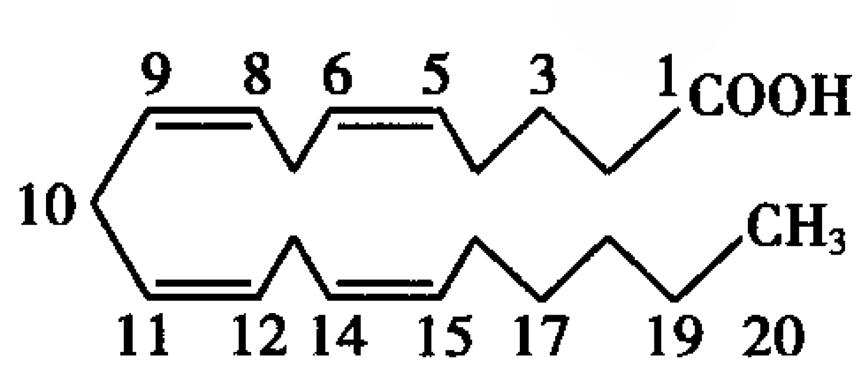
合成脂肪的三分子脂酸可为同一种脂酸，亦可是三种不同的脂酸。合成所需的3-磷酸甘油主要由糖代谢提供。肝、肾等组织含有甘油激酶，能利用游离甘油，使之磷酸化生成3-磷酸甘油。脂肪细胞缺乏甘油激酶因而不能利用甘油合成脂肪。

五、几种多不饱和脂酸衍生物具有重要生理功能

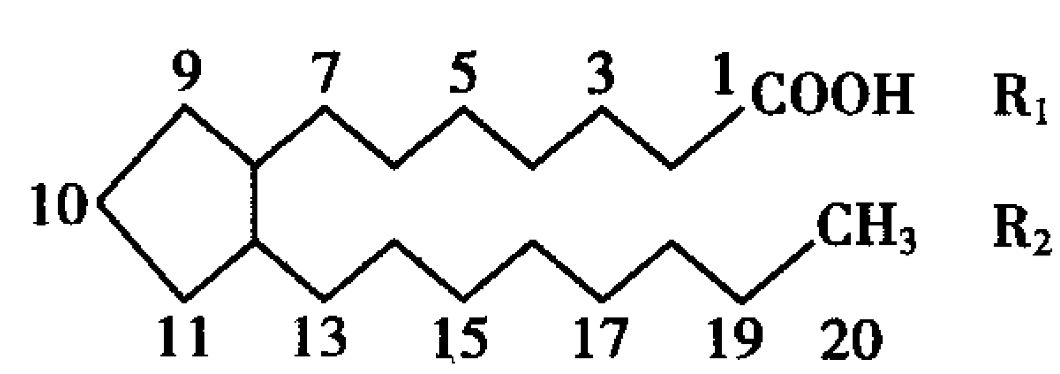
20世纪30年代瑞典Von Euler等发现人精液中含有一种可使平滑肌收缩的物质，认为来自前列腺，故称之为前列腺素（PG）。随后发现前列腺素来源广泛，种类繁多，均为廿碳多不饱和脂酸的衍生物。1973年M. Hamberg及B. Samuelsson从血小板提取了血栓烷（TXA_2），证明也是廿碳多不饱和脂酸的衍生物。1979年B. Samuelsson等从白细胞分离出一类活性物质，具有三个共轭双键，是廿碳多不饱和脂酸衍生而来，称之为白三烯（LTs）。研究表明PG、TXA_2及LTs几乎参与了所有细胞代谢活动，且与炎症、免疫、过敏、心血管病等重要病理生理过程有关，在调节细胞代谢上也具有重要作用。

（一）前列腺素、血栓烷、白三烯的化学结构及命名

前列腺素是一类具有廿个碳原子的多不饱和脂酸衍生物，以前列腺酸（prostanoic acid）为基本骨架，具有一个五碳环和两条侧链（R_1及R_2）。

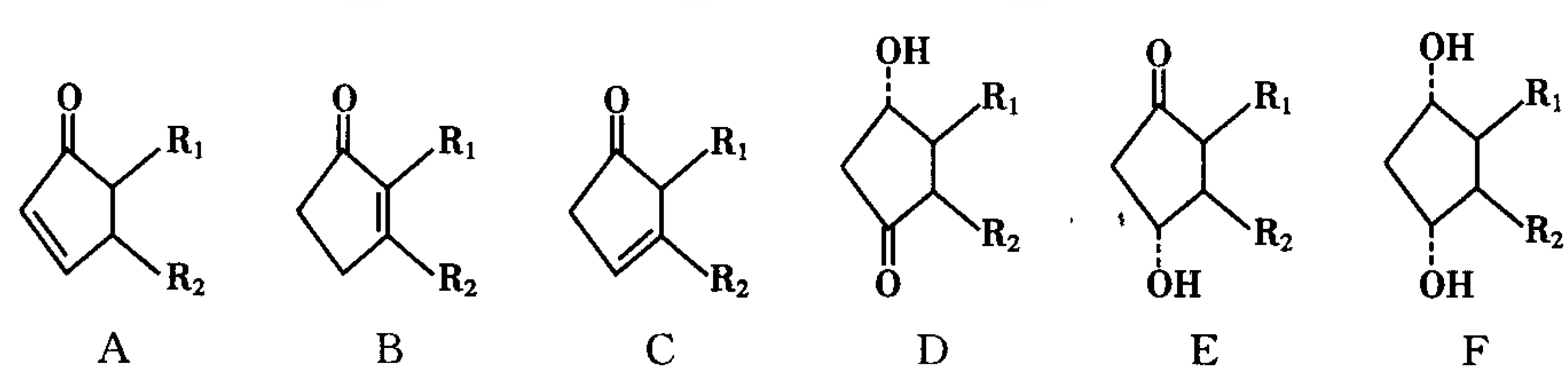


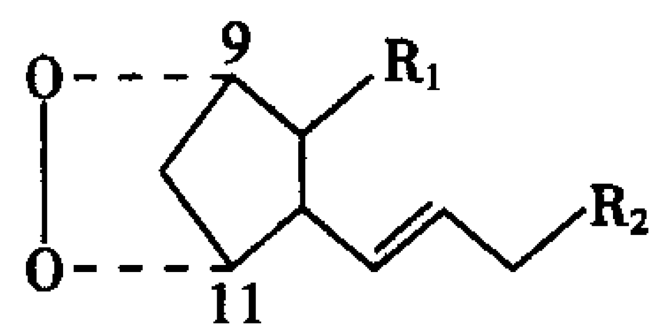
花生四烯酸
(20:4, $\Delta^{5,8,11,14}$)



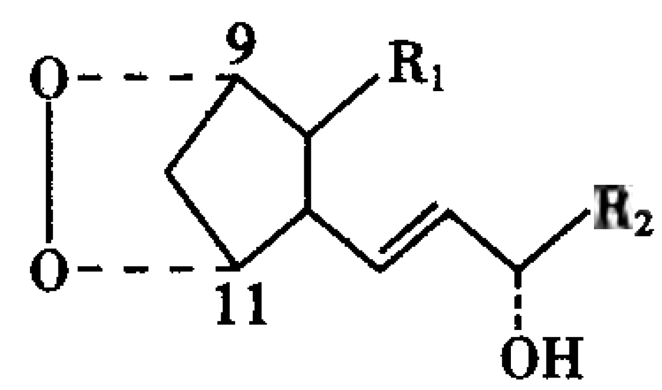
前列腺酸

根据五碳环上取代基团和双键位置不同，PG分为9型，分别命名为PGA、PGB、PGC、PGD、PGE、PGF、PGG、PGH及PGI，体内PGA、PGE及PGF较多。PGG_2和PGH_2是PG合成过程中的中间物，在C_9和C_{11}之间有过氧化键相连。PGI_2是带双环的PG，除五碳环外，还有一个含氧的五碳环，因此又称为前列腺环素（prostacyclin）。前列腺素F第9位碳原子上的羟基有两种立体构型。OH基位于五碳环平面之下为α-型，用虚线连接；位于平面之上为β-型，用实线表示。天然前列腺素均为α-型，不存在β-型。

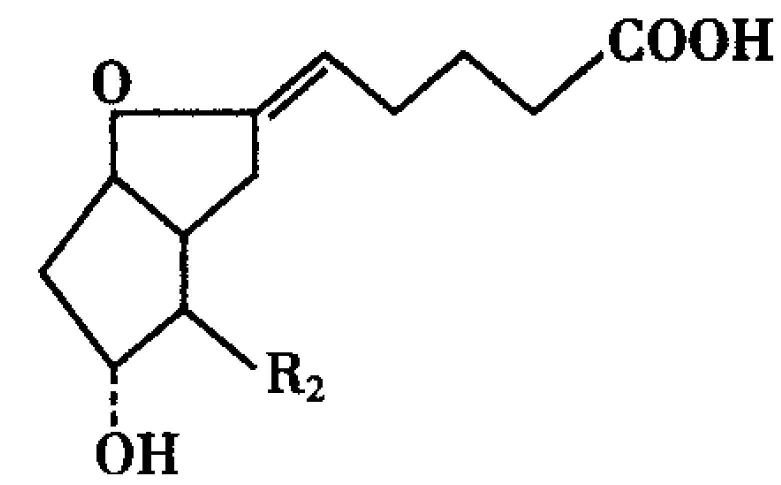




G

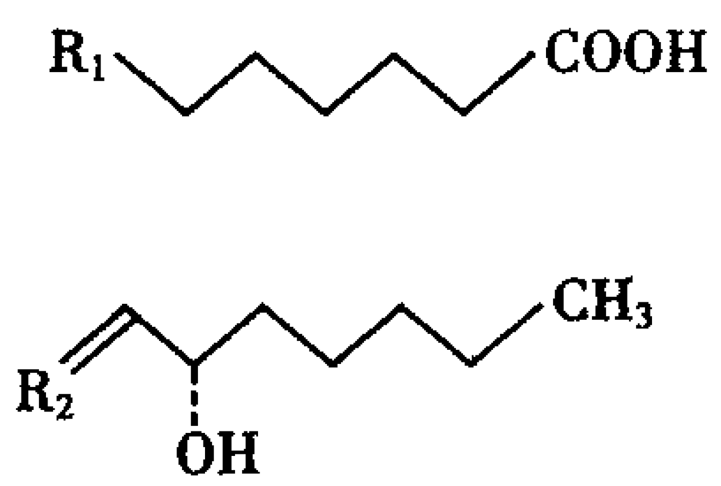


H

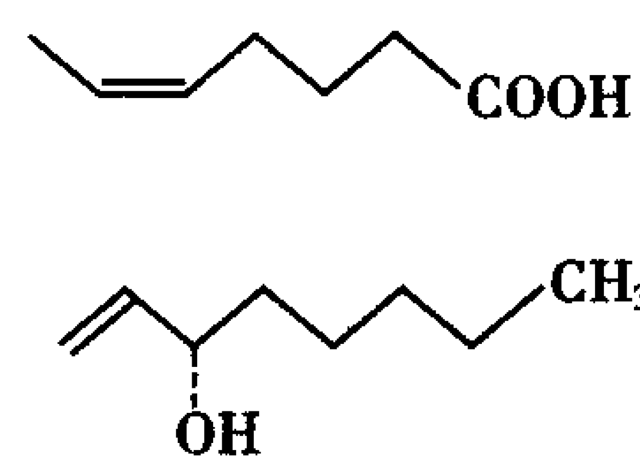


I

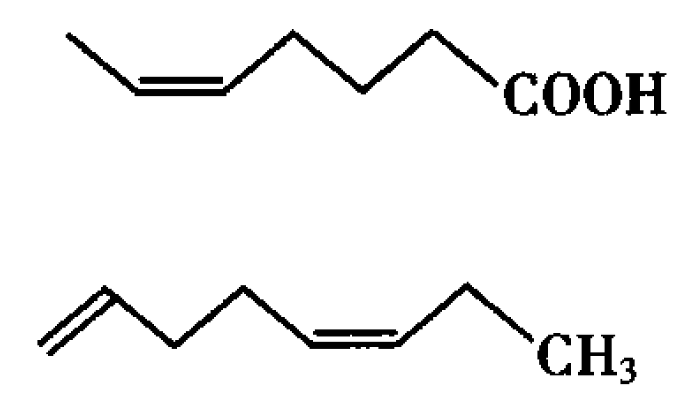
根据其 R_1 及 R_2 两条侧链中双键数目的多少，PG 又分为 1，2，3 类，在字母的右下角标示。



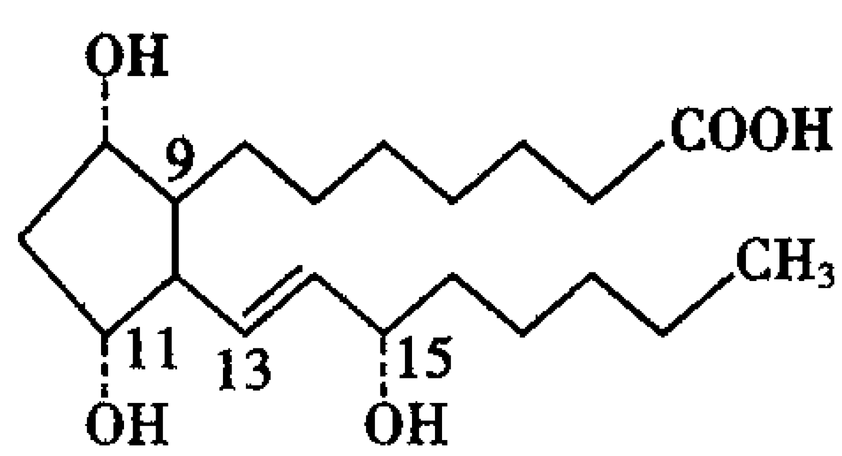
1类



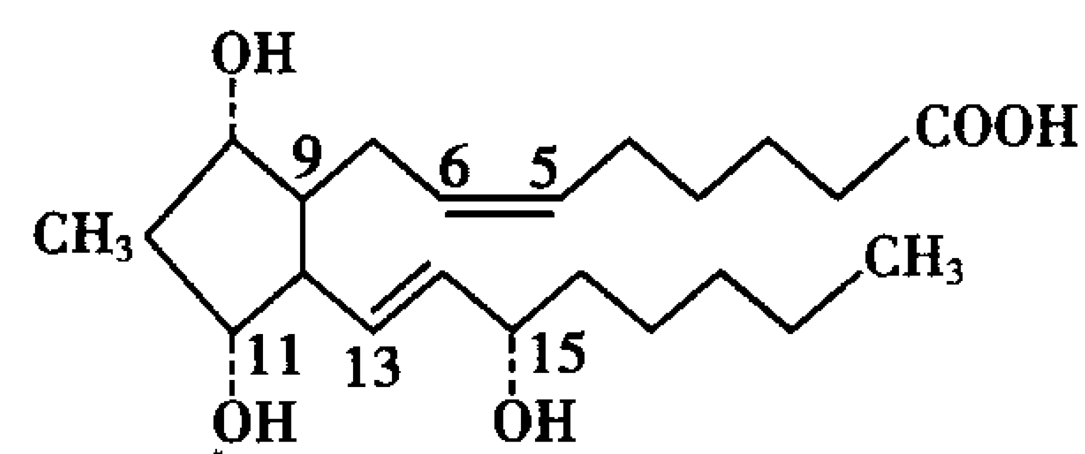
2类



3类

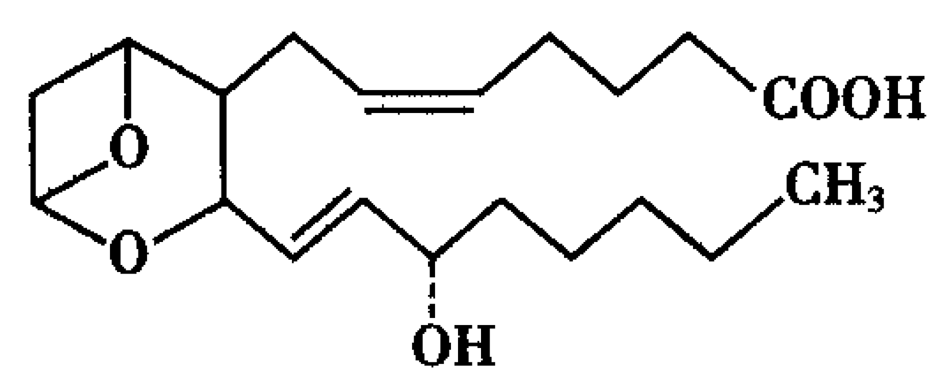


$PGF_1\alpha$



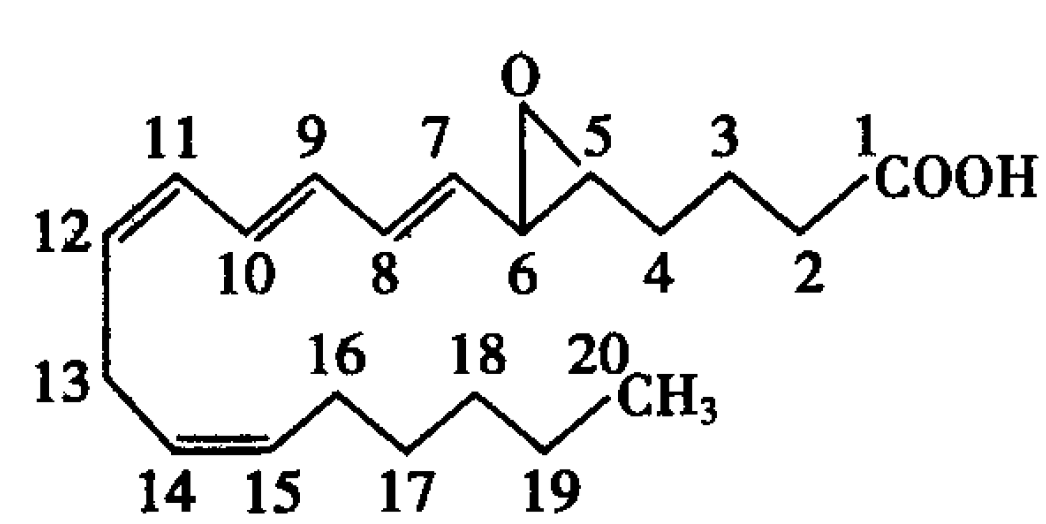
$PGF_2\alpha$

血栓烷也是廿碳不饱和脂酸的衍生物，它有前列腺酸样骨架但又不相同，分子中的五碳环为含氧的烷所取代。



血栓噁烷A_2

白三烯是不含前列腺酸骨架的廿碳多不饱和脂酸。一般 LT 有 4 个双键，所以在 LT 字母的右下方标以 4。LT 合成的初级产物为 LTA_4，在 5，6 位上有一氧环。如在 12 位加水引入羟基，并将 5，6 位的环氧键断裂，则为 LTB_4。如 LTA_4 的 5，6 环氧键打开，在 6 位与谷胱甘肽反应则生成 LTC_4、LTD_4 及 LTE_4 等衍生物。现已证明过敏反应的慢反应物质（slow reacting substance of anaphylaxis，SRS-A）就是三者的混合物。



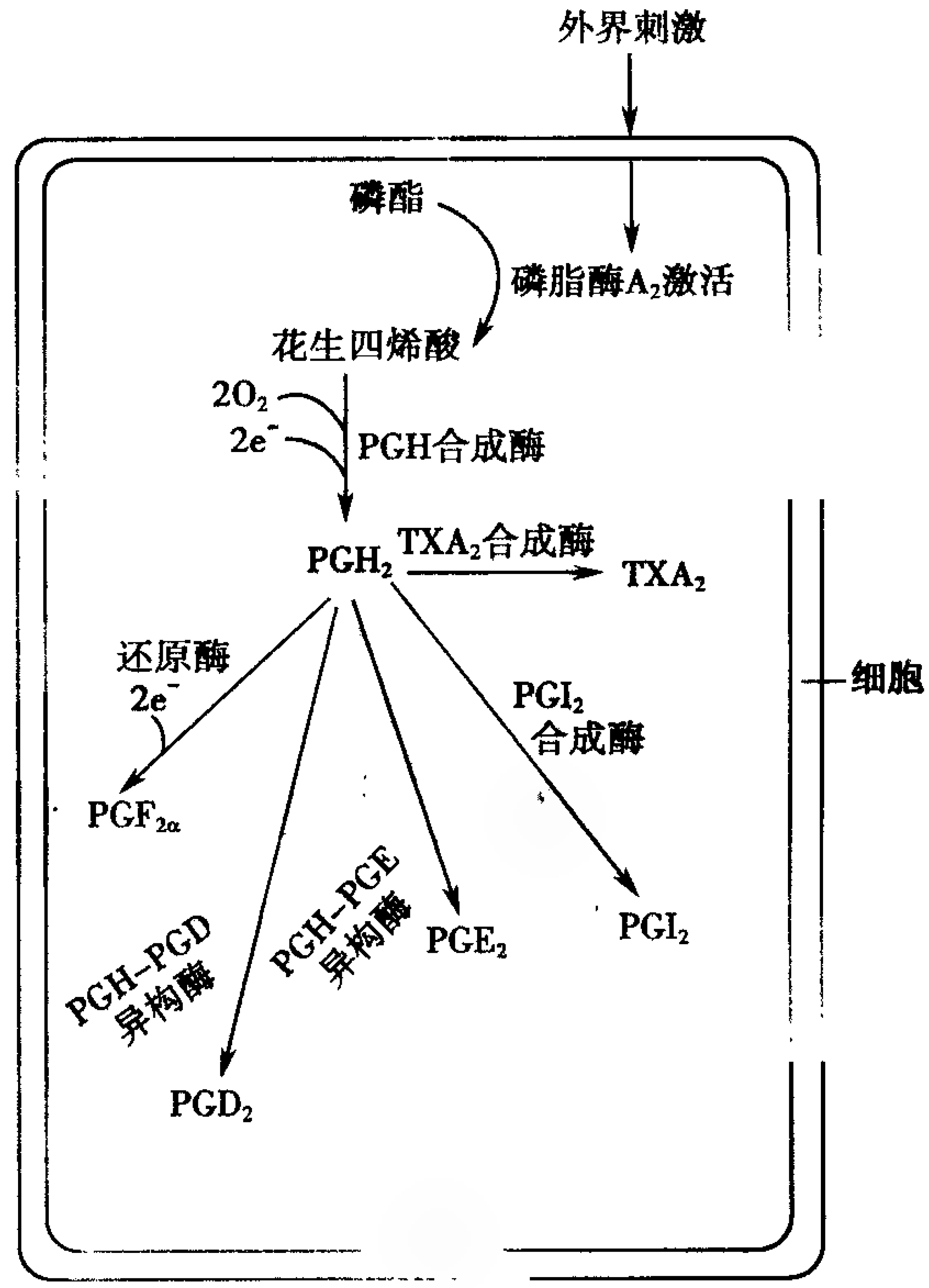
白三烯A_4 (LTA_4)

（二）PG、TX 及 LT 的合成

1. 前列腺素及血栓烷的合成　除红细胞外，全身各组织均有合成 PG 的酶系，血小板尚有血栓烷合成酶。细胞膜中的磷脂含有丰富的花生四烯酸。当细胞受到外界刺激，如血管紧张素Ⅱ（angiotensin Ⅱ）、缓激肽（bradykinin）、肾上腺素、凝血酶及某些抗原抗体复合物或一些病理因子等，细胞膜中磷脂酶 A_2 被激活，使磷脂水解释出花生四烯酸，然

后在一系列酶作用下合成 PG、TX（图 5-10）。

2. 白三烯的合成 花生四烯酸在脂氧合酶（lipoxygenase）作用下生成氢过氧化廿碳四烯酸（5-hydroperoxy-eicotetraenoic acid，5-HPETE），然后在脱水酶作用下生成 LTA_4。LTA_4 在酶催化下转变成具有重要生物活性的化合物，如 LTB_4、LTC_4、LTD_4 及 LTE_4 等。



●图 5-10 前列腺素及血栓噁烷的合成

（三）PG、TX 及 LT 的主要生理功能

PG、TX 及 LT 在细胞内含量很低，仅 10^{-11} mol/L，但具有很强的生理活性。

1. PG 的主要生理功能 PGE_2 能诱发炎症，促进局部血管扩张，毛细血管通透性增加，引起红、肿、痛、热等症状。PGE_2、PGA_2 使动脉平滑肌舒张，有降低血压的作用。PGE_2 及 PGI_2 抑制胃酸分泌，促进胃肠平滑肌蠕动。卵泡产生的 PGE_2 及 $PGF_{2\alpha}$ 在排卵过程中起重要作用。$PGF_{2\alpha}$ 可使卵巢平滑肌收缩，引起排卵。子宫释放的 $PGF_{2\alpha}$ 能使黄体溶解。分娩时子宫内膜释出的 $PGF_{2\alpha}$ 能引起子宫收缩加强，促进分娩。

2. TX 的主要生理功能 血小板产生的 TXA_2 及 PGE_2 促进血小板聚集，血管收缩，促进凝血及血栓形成。而血管内皮细胞释放的 PGI_2 则有很强的舒血管及抗血小板聚集，抑制凝血及血栓形成的作用，与 TXA_2 的作用对抗。北极地区因纽特人摄食富含廿碳五烯酸（EPA）的海水鱼类食物，因而能在体内合成 PGE_3，PGI_3 及 TXA_3 等三类化合物。PGI_3 能抑制花生四烯酸从膜磷脂释放，因而抑制 PGI_2 及 TXA_2 的合成。由于 PGI_3 的活性与 PGI_2 相同，而 TXA_3 则较 TXA_2 弱得多，因此因纽特人抗血小板聚集及抗凝血作用较强，被认为是他们不易患心肌梗死的重要原因之一。

3. LT 的主要生理功能 已证实过敏反应的慢反应物质是 LTC_4、LTD_4 及 LTE_4 的混合物，其使支气管平滑肌收缩的作用较组胺及 $PGF_{2\alpha}$ 强 100～1000 倍，作用缓慢而持久。此外，LTB_4 还能调节白细胞的功能，促进其游走及趋化作用，刺激腺苷酸环化酶，诱发多形核白细胞脱颗粒，使溶酶体释放水解酶类，促进炎症及过敏反应的发展。

IgE 与肥大细胞表面受体结合，可引起肥大细胞释放 LTC_4、LTD_4 及 LTE_4，三者引起支气管及胃肠平滑肌剧烈收缩。LTD_4 还使毛细血管通透性增加，LTB_4 使中性及嗜酸性粒细胞游走，引起炎症细胞浸润。

第四节 磷脂代谢

一、含磷酸的脂类被称为磷脂

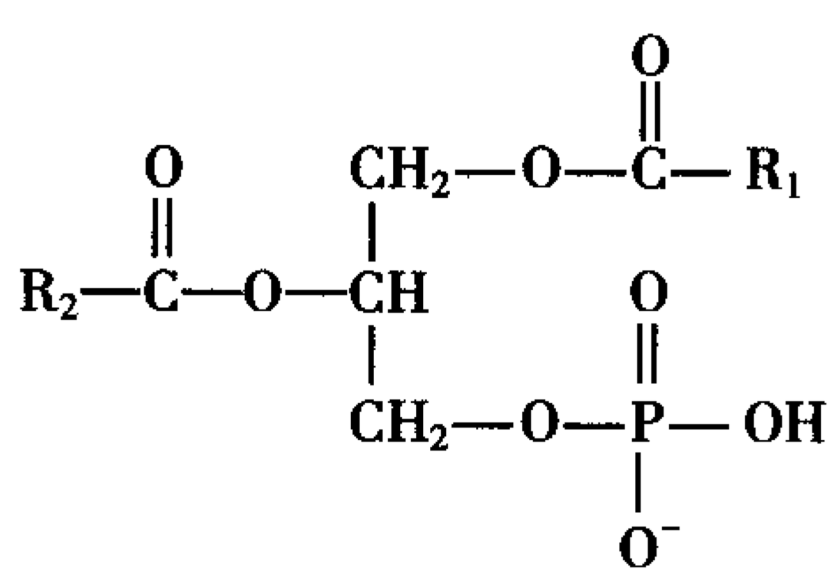
磷脂主要由甘油或鞘氨醇、脂酸、磷酸和含氮化合物等组成。根据磷脂的组成主要分为甘油磷脂和鞘磷脂，由甘油构成的磷脂统称为甘油磷脂；由鞘氨醇或二氢鞘氨醇构成的磷脂称为鞘磷脂。两类磷脂组成成分的异同如表 5-2。

表 5-2　两类磷脂的分子组成

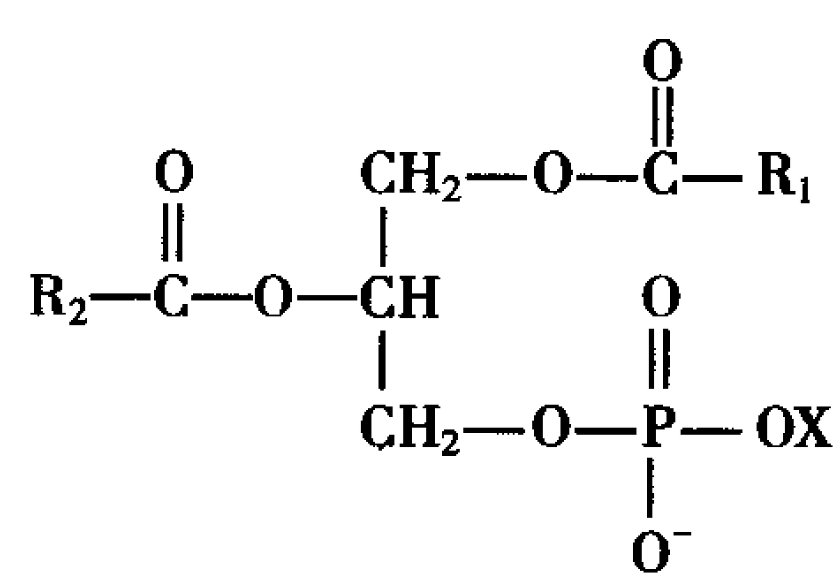
	相同的组成成分（分子数）			不同或不尽相同的组成成分
	磷　酸	脂　酸	醇　类	其他成分
甘油磷脂	1	2	甘油	胆碱、乙醇胺、丝氨酸、肌醇等
鞘磷脂	1	1	鞘氨醇	胆碱

（一）由甘油构成的磷脂统称为甘油磷脂

甘油磷脂又称为磷酸甘油酯（phosphoglycerides）。其结构特点是甘油的两个羟基被脂酸酯化，3 位羟基被磷酸酯化成为磷脂酸（phosphatidic acid；PA），其中 1 位羟基常被饱和脂酸酯化，2 位羟基常被 C_{16}～C_{20} 的不饱和脂酸如花生四烯酸酯化。磷脂酸的磷酸羟基再被氨基醇（如胆碱、乙醇胺或丝氨酸）或肌醇等取代，形成不同类型的甘油磷脂，见表 5-3。每一类磷脂又因所酯化的脂酸的不同而分为若干种。甘油磷脂的基本结构如下结构图，X 代表不同的酯化基团。

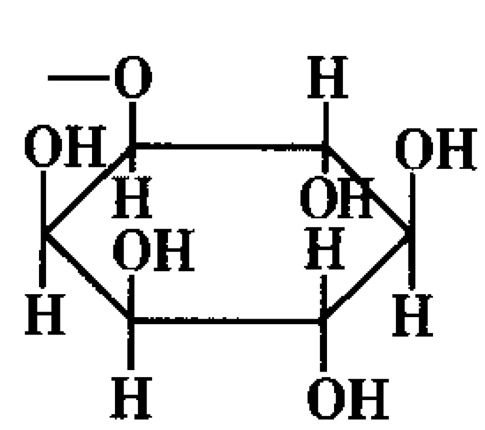
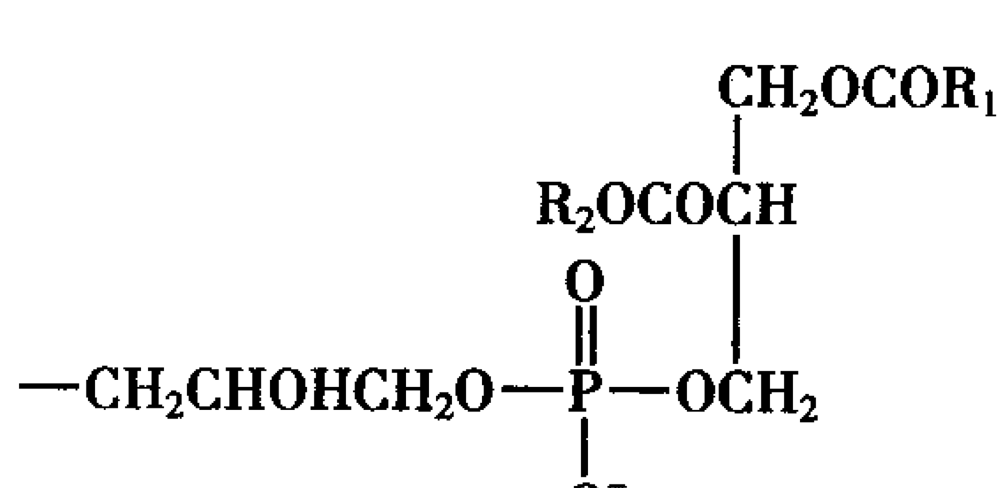


磷脂酸



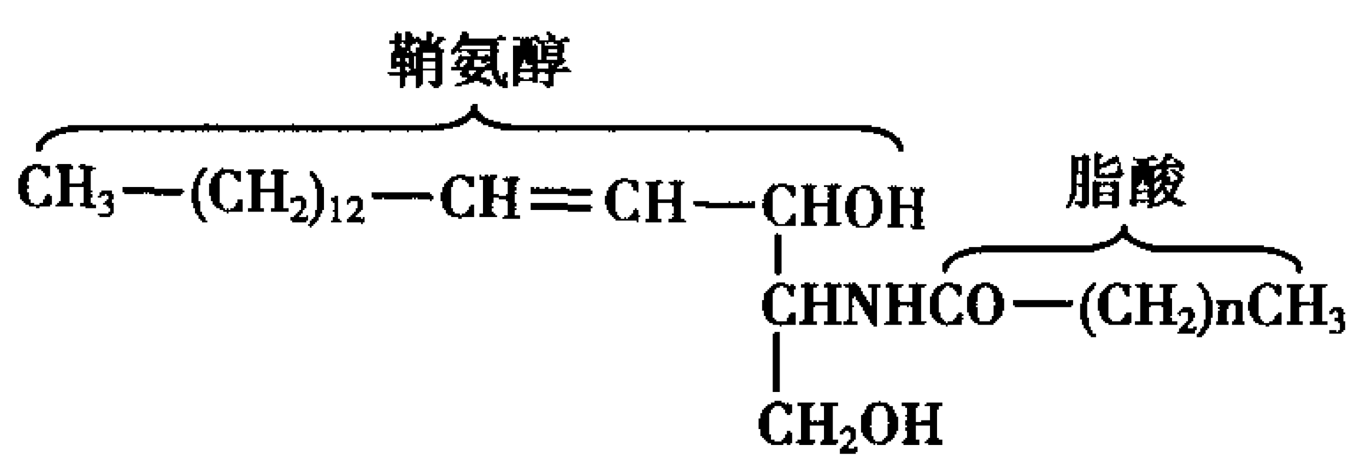
甘油磷脂

表 5-3　体内几种重要的甘油磷脂

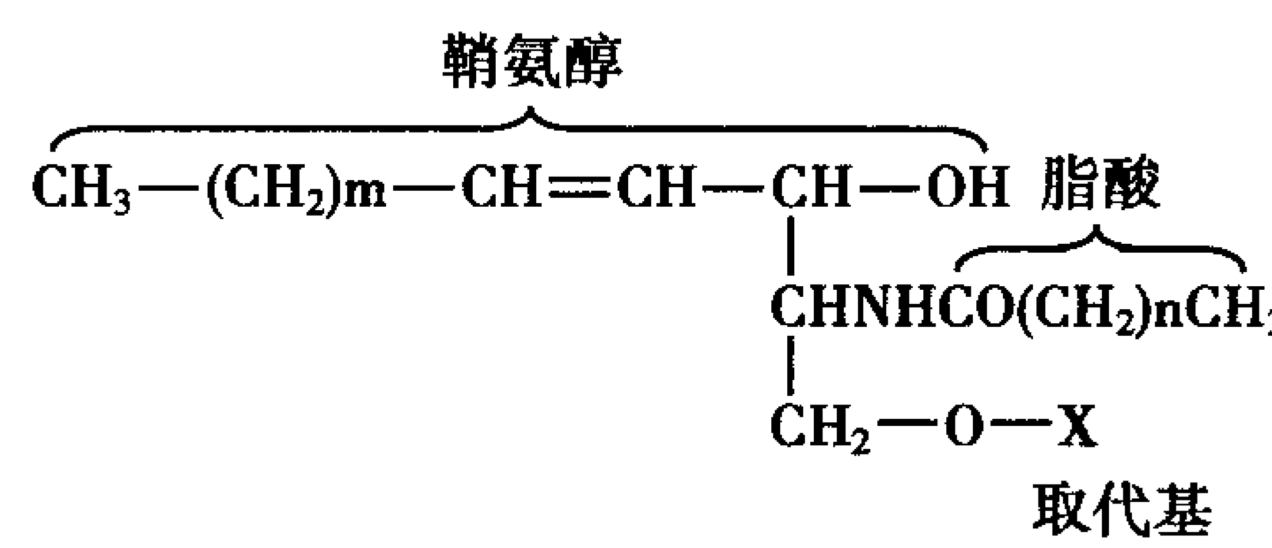
HO-X	X 取代基团	甘油磷脂名称
水	$-H$	磷脂酸
胆碱	$-CH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$	磷脂酰胆碱（卵磷脂）
乙醇胺	$-CH_2CH_2\overset{+}{N}H_3$	磷脂酰乙醇胺（脑磷脂）
丝氨酸	$-CH_2CH(\overset{+}{N}H_3)-COO^-$	磷脂酰丝氨酸
肌醇		磷脂酰肌醇
甘油	$-CH_2CHOHCH_2OH$	磷脂酰甘油
磷脂酰甘油		二磷脂酰甘油（心磷脂）

（二）由鞘氨醇或二氢鞘氨醇构成的磷脂称为鞘磷脂

鞘氨醇的氨基通过酰胺键与 1 分子长链脂酸相连形成神经酰胺（ceramide），为鞘脂的母体结构。鞘氨醇的羟基通过酯键与取代基团结合而成为不含甘油、仅含鞘氨醇或二氢鞘氨醇的脂类被称为鞘脂，其化学结构通式为：

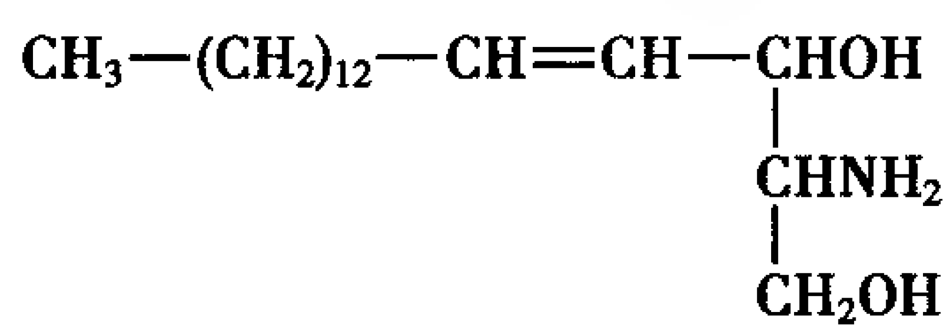


神经酰氨

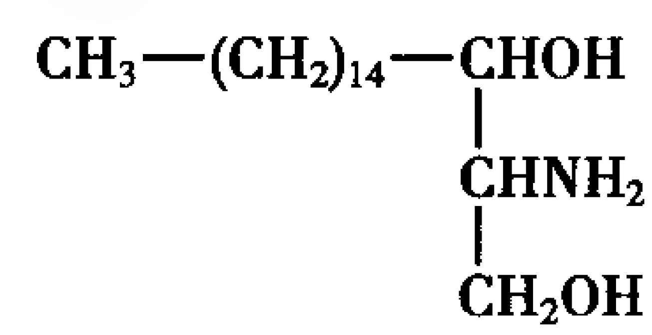


鞘脂

自然界的鞘氨醇以 18 碳最多，但亦存在 16、17、19 和 20 碳鞘氨醇。鞘氨醇分子中含有双键，故有顺反异构体，但自然界均为反式构型。鞘氨醇或二氢鞘氨醇是具有脂肪族长链的氨基二元醇，具有 2 个羟基及 1 个氨基的极性头和疏水的长链脂肪烃尾。其化学结构式为：

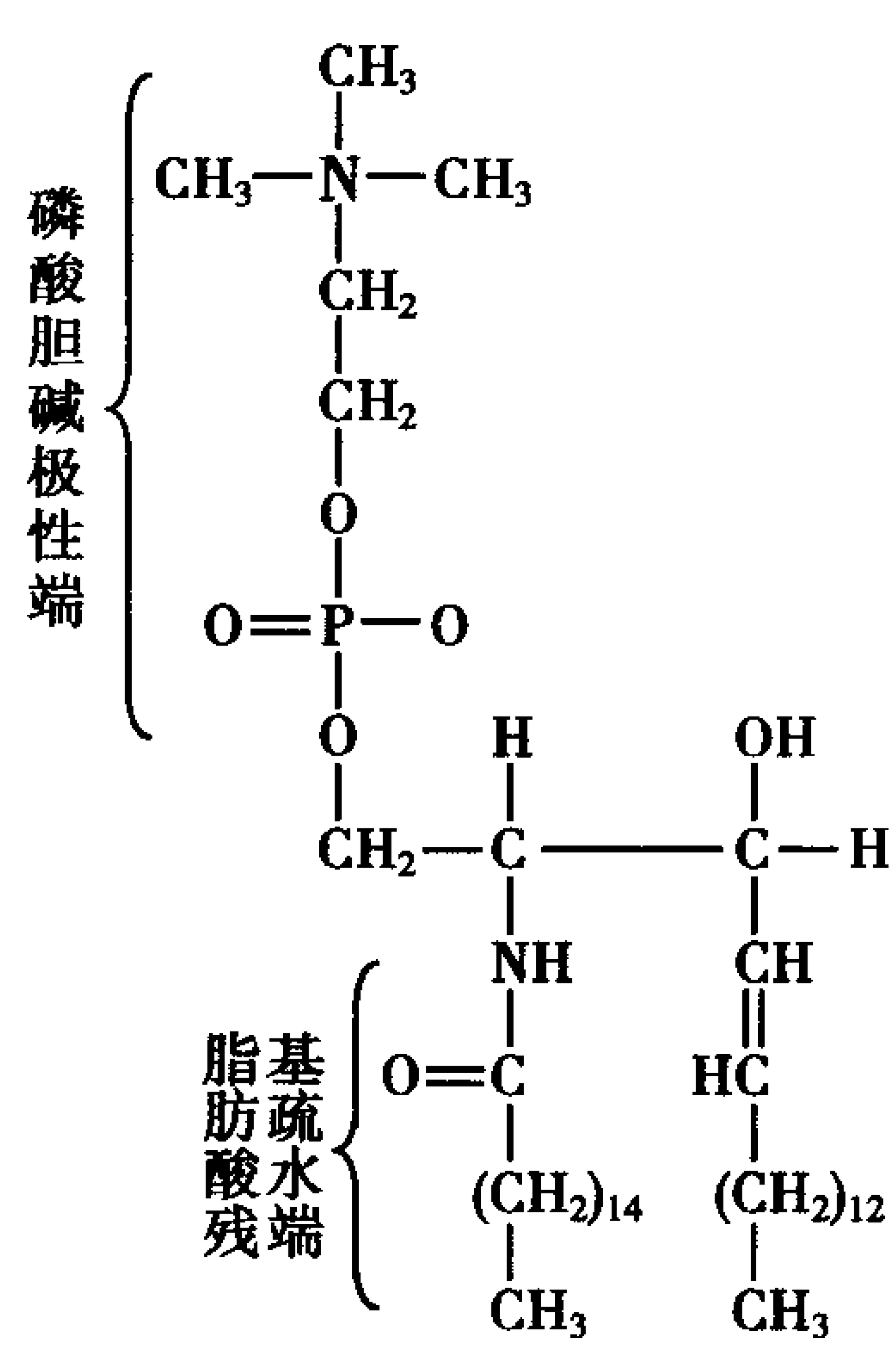


鞘氨醇



二氢鞘氨醇

鞘脂所含的 1 分子脂酸主要为 16、18、22 或 24 碳饱和脂酸或单不饱和脂酸。按取代基 X 的不同，可分为鞘磷脂和鞘糖脂（sphingoglycolipid）两类。鞘磷脂的取代基为磷酸胆碱或磷酸乙醇胺；神经酰胺与磷酸胆碱结合生成神经鞘磷脂，也是构成细胞膜的重要成分，如下图。鞘糖脂广泛存在于体内各组织中，具有十分重要的结构和生理功能。



神经鞘磷酯

二、磷脂在体内具有重要的生理功能

（一）磷脂是构成生物膜的重要成分

具有亲水端和疏水端的磷脂分子在水溶液中，可聚集形成具有空间结构的脂质双层，是构成生物膜的重要成分和结构基础。细胞膜组成十分复杂，主要含甘油磷脂、鞘磷脂、

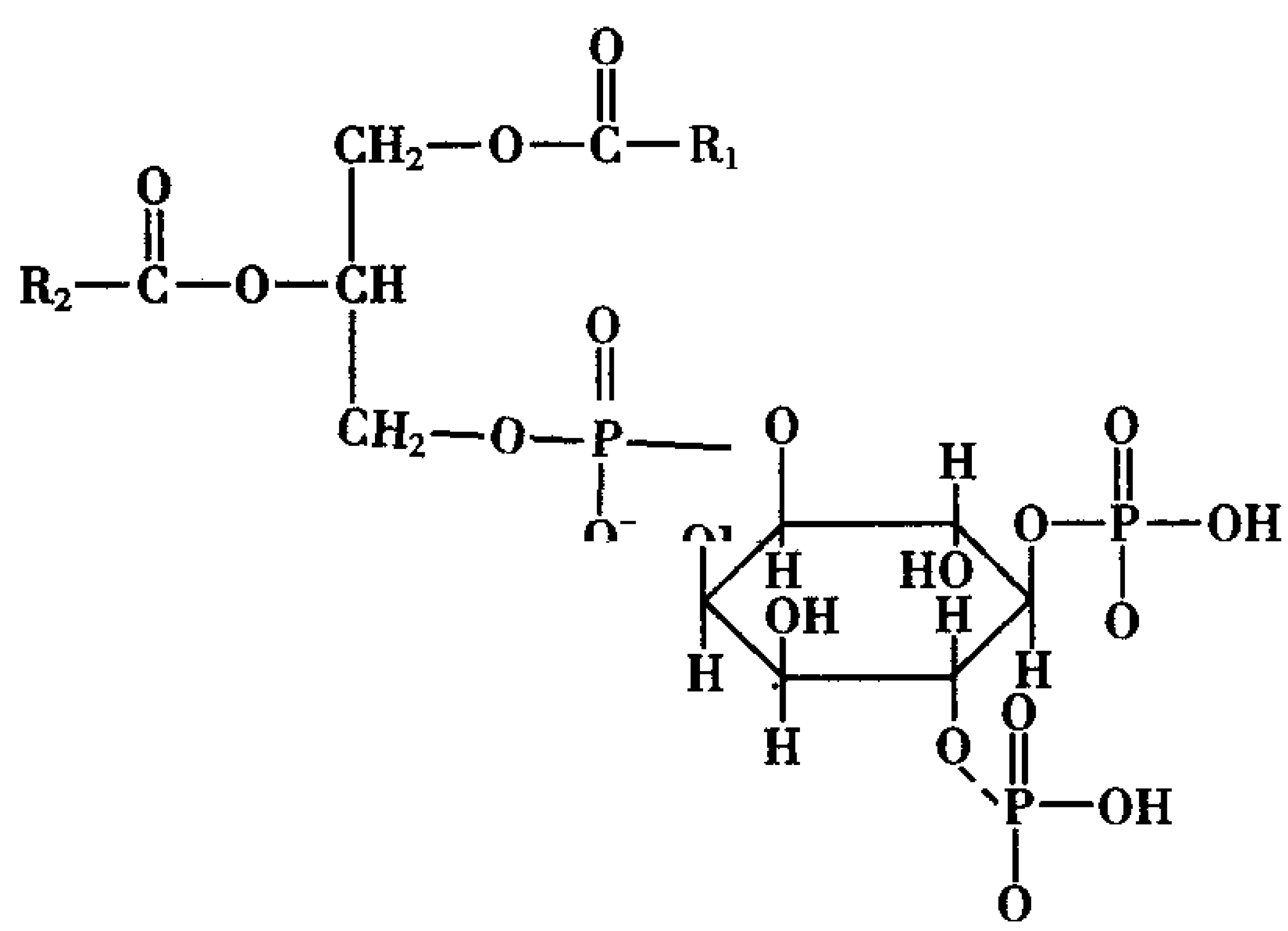
糖脂、胆固醇、蛋白质、碳水化合物和痕迹量的 RNA 等。几乎所有类型的磷脂在细胞膜中均有发现，其中甘油磷脂中以磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸含量最高，鞘磷脂中以神经鞘磷脂为主。

1. 卵磷脂存在于细胞膜中　细胞膜存在大量含胆碱（choline）的磷脂，即磷脂酰胆碱，又称为卵磷脂（lecithin）。卵磷脂是组成细胞膜最丰富的磷脂之一。其甘油 2 位含多不饱和脂酸，被水解后生成溶血卵磷脂，具有十分重要的病理生理作用。同时，卵磷脂也储存着体内大部分胆碱。

2. 心磷脂是线粒体膜的主要脂质　二磷脂酰甘油，又称心磷脂（cardiolipin），是仅有含双甘油的磷脂。1942 年由美国科学家 M. C. Pangborn 从牛心脏中分离提取出的一种磷脂，故称为心磷脂，主要存在于线粒体内膜。心磷脂与大量的线粒体内膜蛋白质，如细胞色素 c 氧化酶、细胞色素 c NADH：泛醌（ubiquinone）等相互作用，激活某些酶，特别与氧化磷酸化和 ATP 的产生密切相关。

（二）磷脂酰肌醇是第二信使的前体

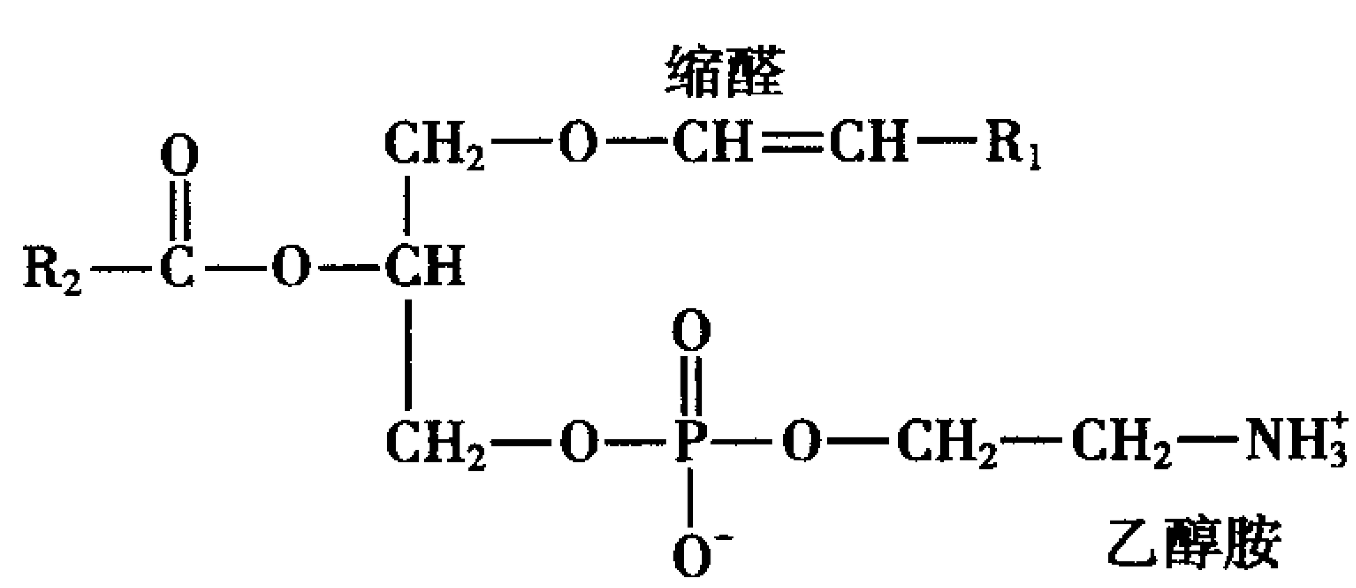
磷脂酰肌醇的 4、5 位羟基被磷酸化生成的磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸（phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate，PIP_2）是细胞膜磷脂的重要组成，主要存在于细胞膜的内层。在激素等刺激下可被裂解为甘油二酯和三磷酸肌醇（inositol triphosphate，IP_3），均为胞内传递刺激信号至细胞核的胞内第二信使。



磷脂酰肌醇4,5-二磷酸

（三）缩醛磷脂存在于脑和心肌组织中

缩醛磷脂（plasmalogens）结构与磷脂酰乙醇胺相似，其甘油的 1 位以缩醛方式与脂酸结合，但乙醇胺可被胆碱、丝氨酸或肌醇取代。其在脑、心肌组织、红细胞和血小板等中含量较高，特别在脑和心肌组织中占总磷脂的 20%以上，确切功能尚不清楚。当缺乏时，可导致罕见的康-亨综合征（rhizomelic chondrodysplasia punctata，RCDP），又称点状软骨发育不良（常染色体显性型）等疾病的发生。



缩醛磷脂

（四）神经鞘磷脂和卵磷脂在神经髓鞘中含量较高

人体含量最多的鞘磷脂是神经鞘磷脂，由鞘氨醇、脂酸及磷酸胆碱所构成。鞘氨醇的

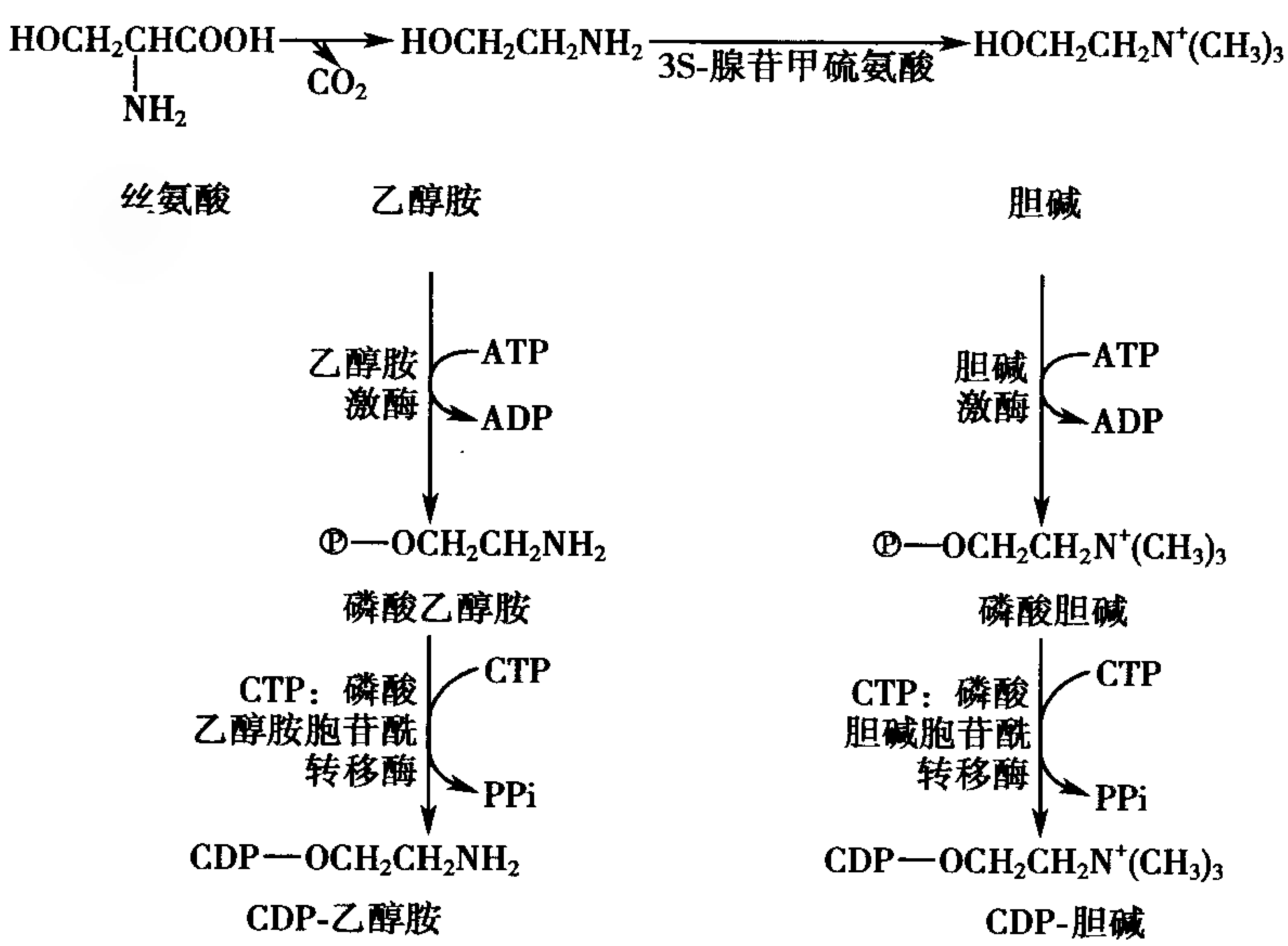
氨基通过酰胺键与脂酸相连，生成 N-脂酰鞘氨醇（ceramide，又称神经酰胺），其末端羟基与磷酸胆碱通过磷酸酯键相连即为神经鞘磷脂。神经鞘磷脂是构成生物膜的重要磷脂，它常与卵磷脂并存于细胞膜的外侧。神经髓鞘含脂类甚多，占干重的 97%，其中 11% 为卵磷脂，5% 为神经鞘磷脂。人红细胞膜 20%～30% 为神经鞘磷脂。

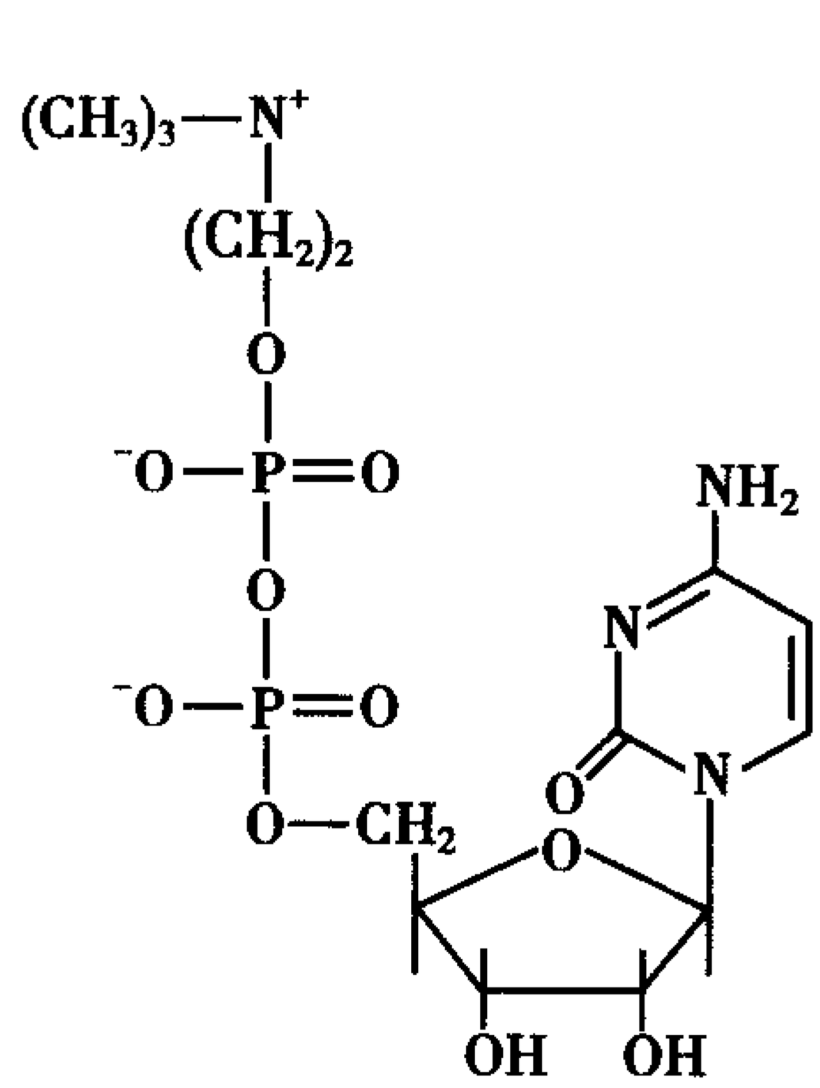
三、甘油磷脂的合成与降解

（一）甘油磷脂的合成

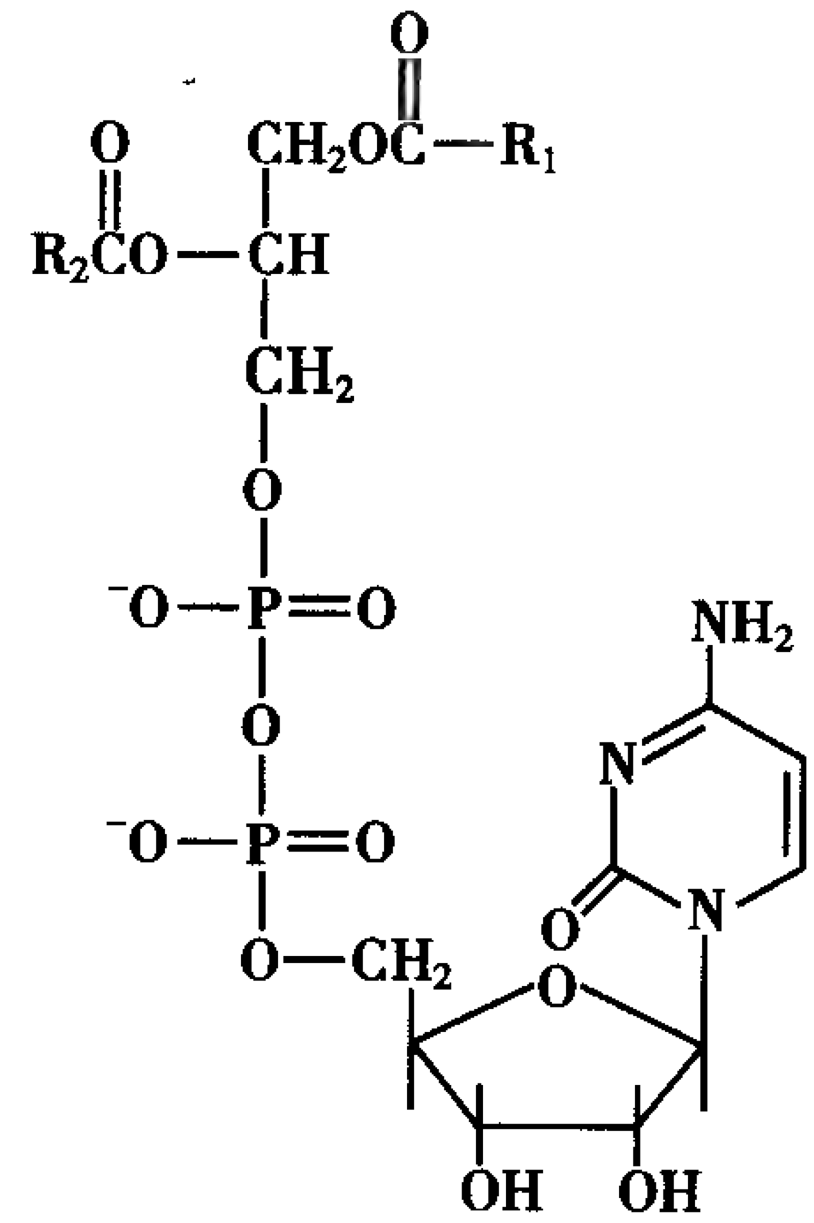
1. 合成部位 人体全身各组织细胞因其内质网均含有甘油磷脂合成酶系，均能合成甘油磷脂，但以肝、肾及肠等组织细胞最活跃。

2. 合成的原料及辅因子 甘油磷脂合成的基本原料为甘油、脂酸、磷酸盐、胆碱、丝氨酸、肌醇(inositol)等。除脂酸、甘油主要由葡萄糖代谢转化而来外，其 2 位的多不饱和脂酸必须从植物油摄取。胆碱可由食物供给，亦可由丝氨酸及甲硫氨酸在体内合成。丝氨酸本身是合成磷脂酰丝氨酸的原料，脱羧后生成的乙醇胺又是合成磷脂酰乙醇胺的前体。乙醇胺由 S-腺苷甲硫氨酸获得 3 个甲基即可合成胆碱。合成除需 ATP 外，还需 CTP 参加。CTP 在磷脂合成中特别重要，它为合成 CDP-乙醇胺、CDP-胆碱及 CDP-甘油二酯等活化中间物所必需。





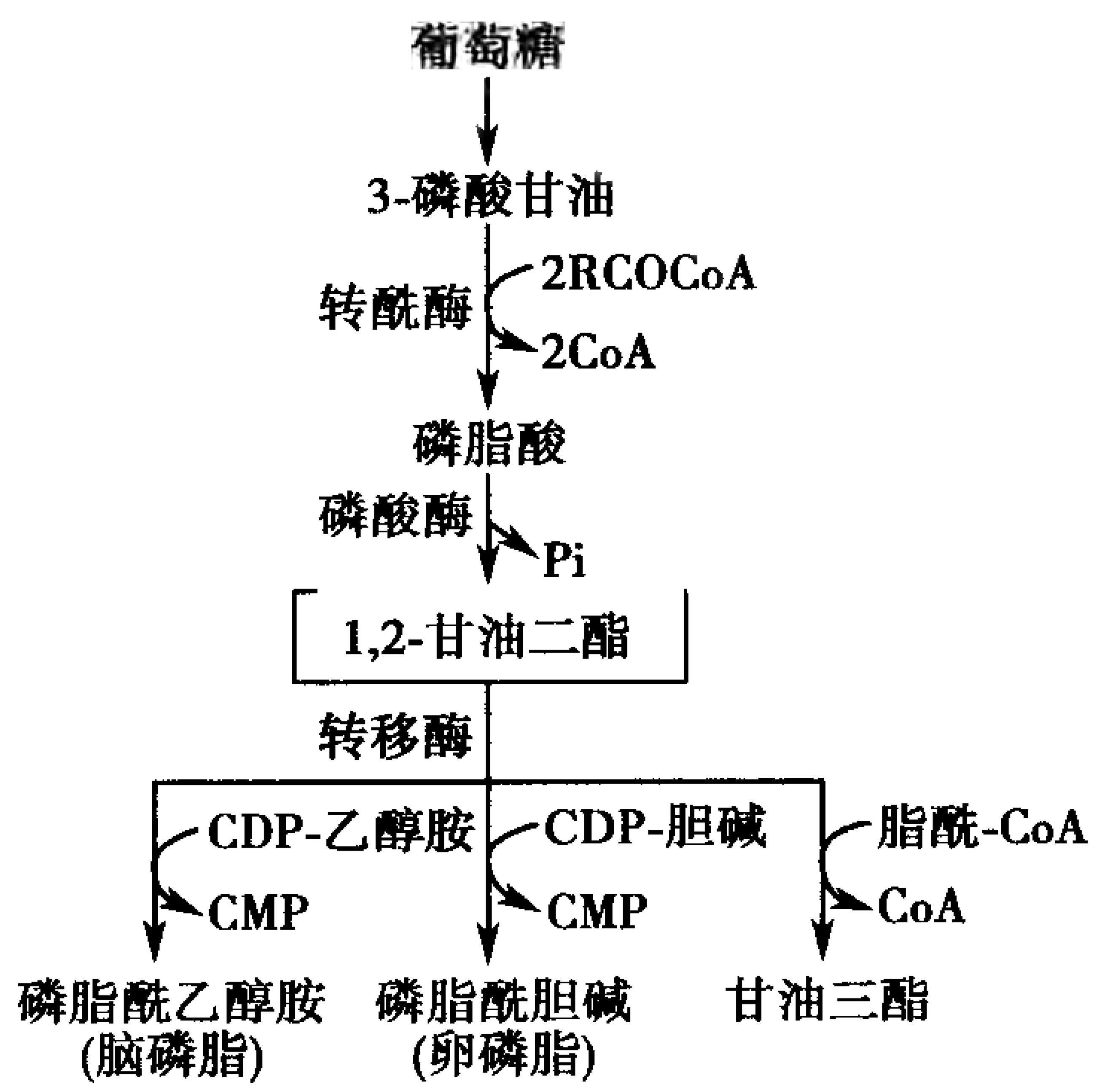
CDP-胆碱

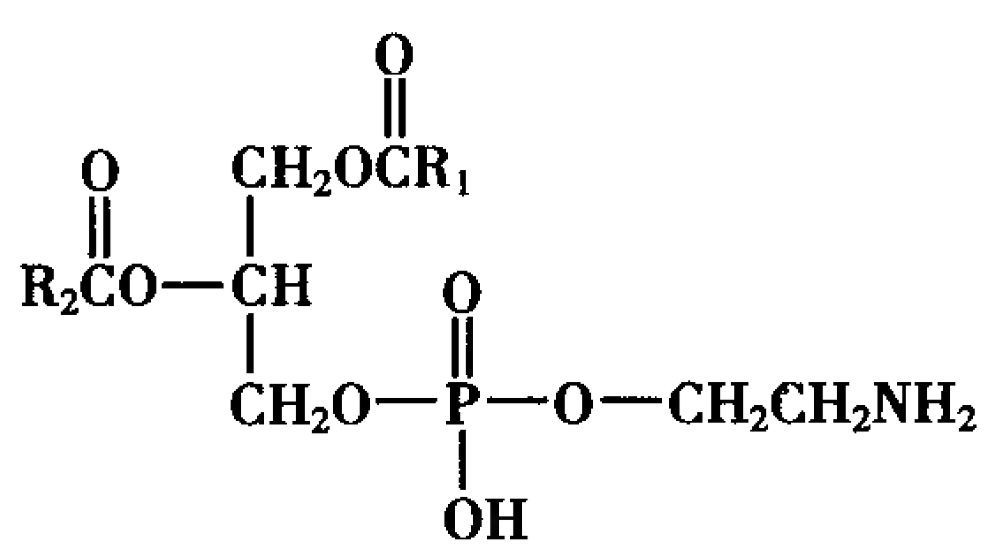


CDP-甘油二酯

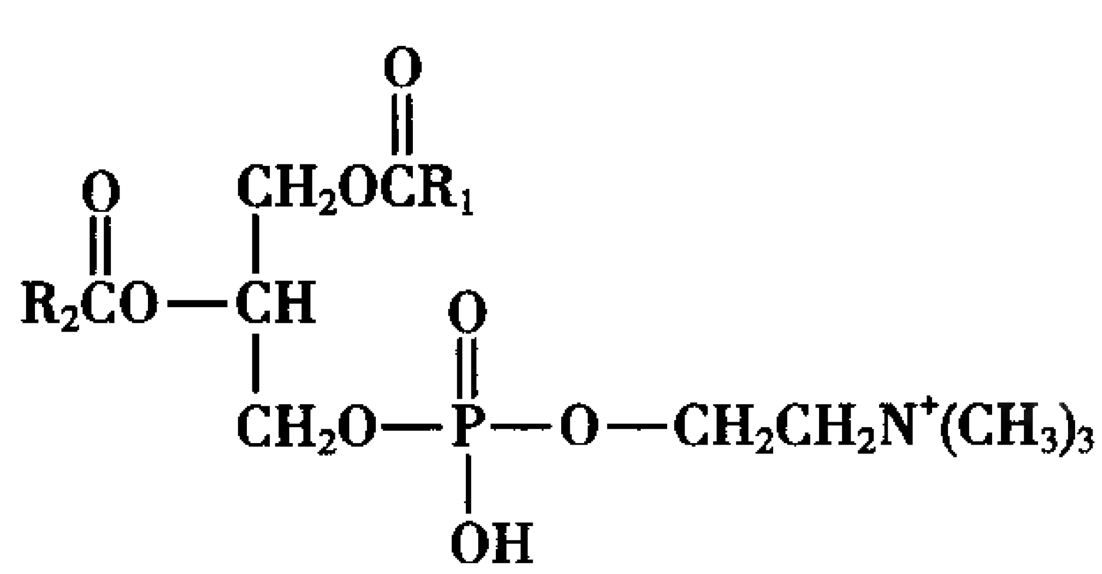
3. 合成基本过程　甘油磷脂的合成有两条途径，即甘油二酯合成途径和CDP-甘油二酯合成途径。不同的甘油磷脂采用的合成途径不同。

（1）甘油二酯合成途径：磷脂酰胆碱及磷脂酰乙醇胺主要通过此途径合成。这两类磷脂在体内含量最多，占组织及血液中磷脂的75%以上。甘油二酯是合成的重要中间物。胆碱及乙醇胺由活化的CDP-胆碱及CDP-乙醇胺提供。其合成过程如下：



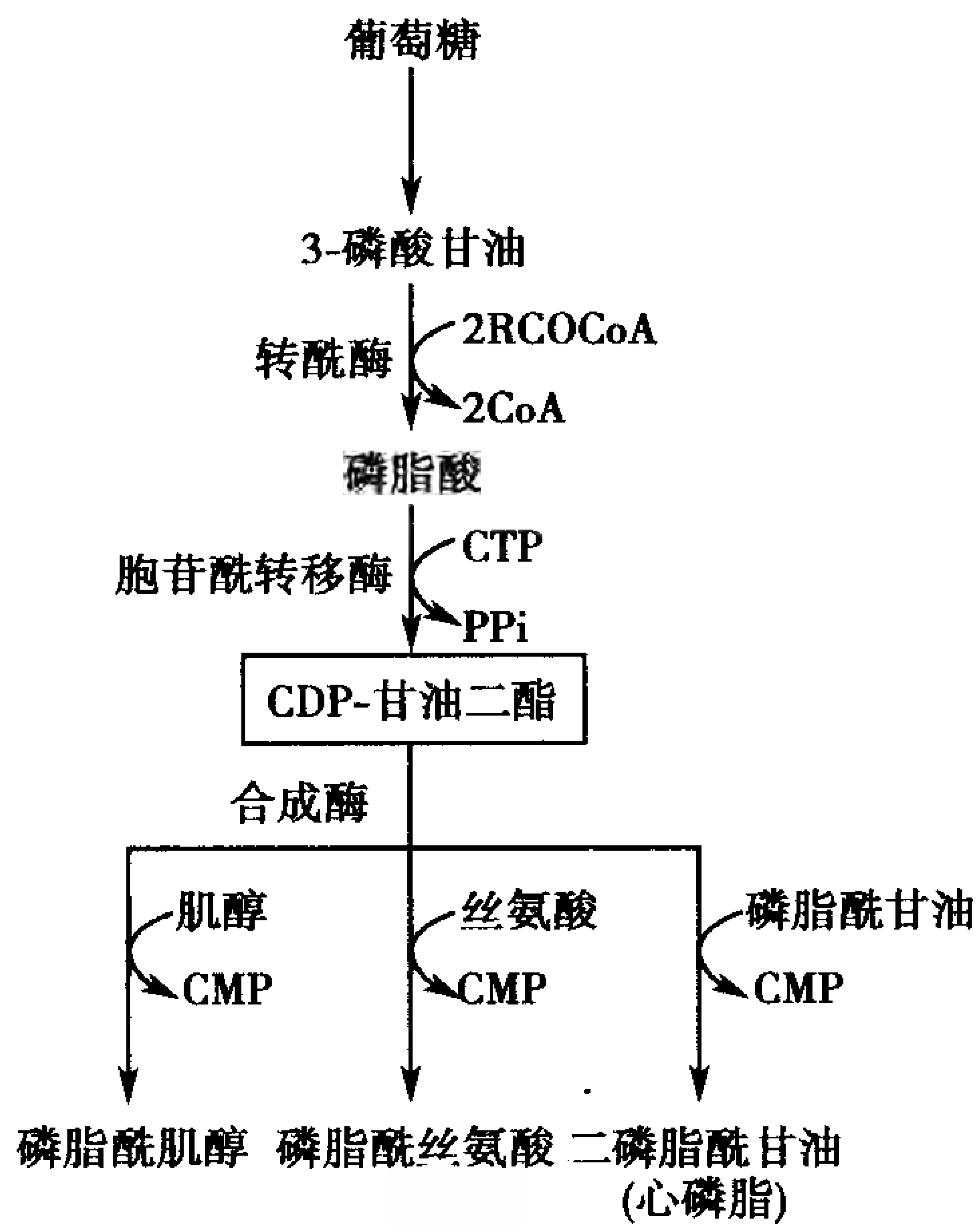


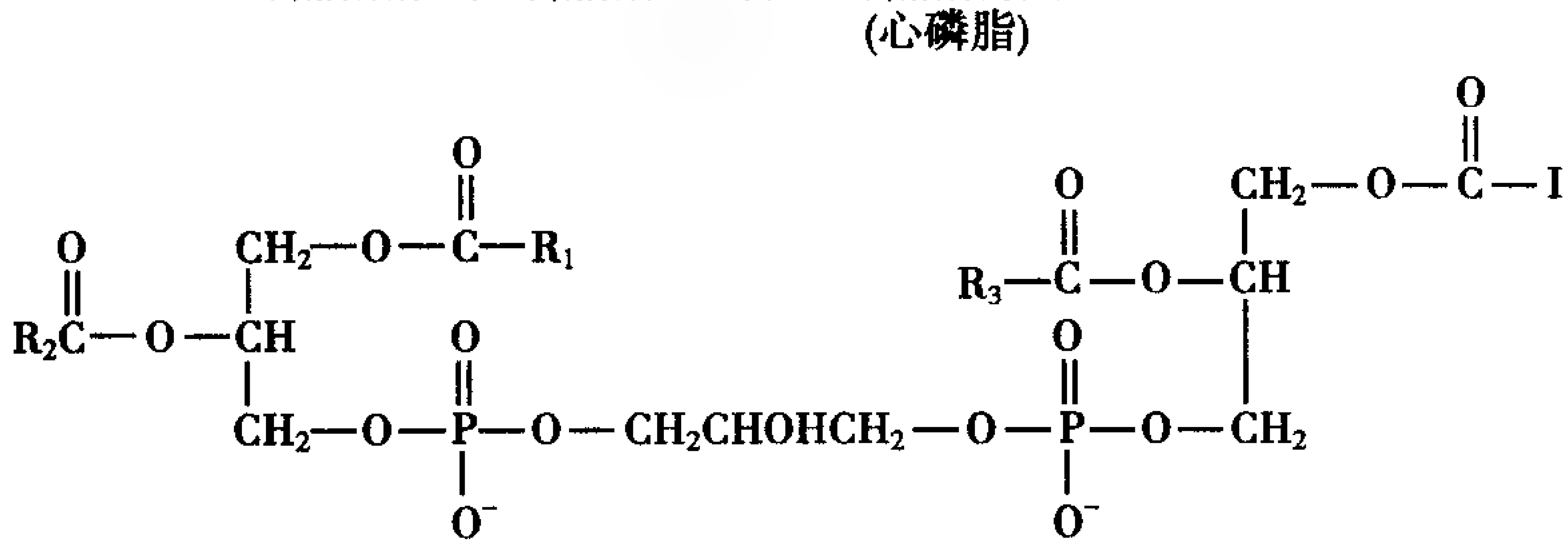
脑磷脂



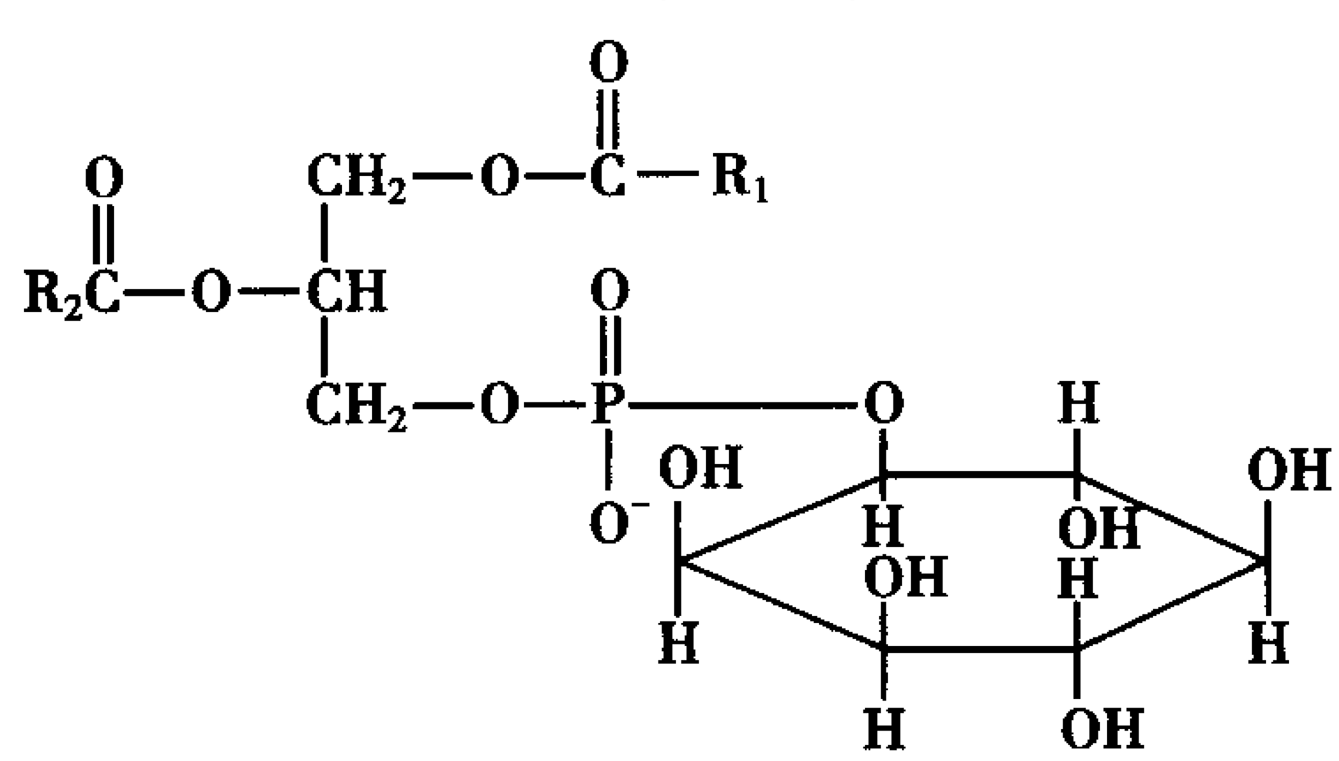
卵磷脂

（2）CDP-甘油二酯合成途径：磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、心磷脂由此途径合成。由葡萄糖生成磷脂酸与上述途径相同。不同的是磷脂酸不被磷酸酶水解，本身即为合成这类磷脂的前体。然后，磷脂酸由CTP提供能量，在磷脂酰胞苷转移酶的催化下，生成活化的CDP甘油二酯。CDP-甘油二酯是合成这类磷脂的直接前体和重要中间物，在相应合成酶的催化下，与丝氨酸、肌醇或磷脂酰甘油缩合，即生成磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇或心磷脂。

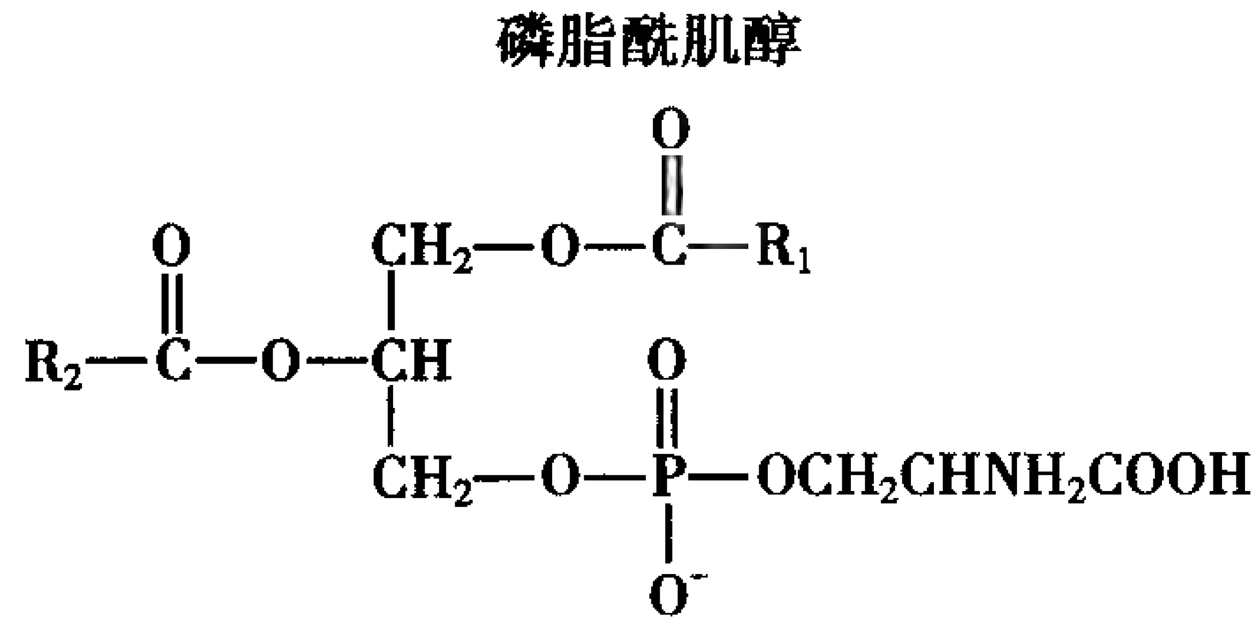




二磷脂酰甘油(心磷脂)



磷脂酰肌醇



磷脂酰丝氨酸

以上是各类磷脂合成的基本过程。此外磷脂酰胆碱亦可由磷脂酰乙醇胺从S-腺苷甲硫氨酸获得甲基生成，通过这种方式合成占人肝的10%～15%。磷脂酰丝氨酸可由磷脂酰乙醇胺羧化或其乙醇胺与丝氨酸交换生成。

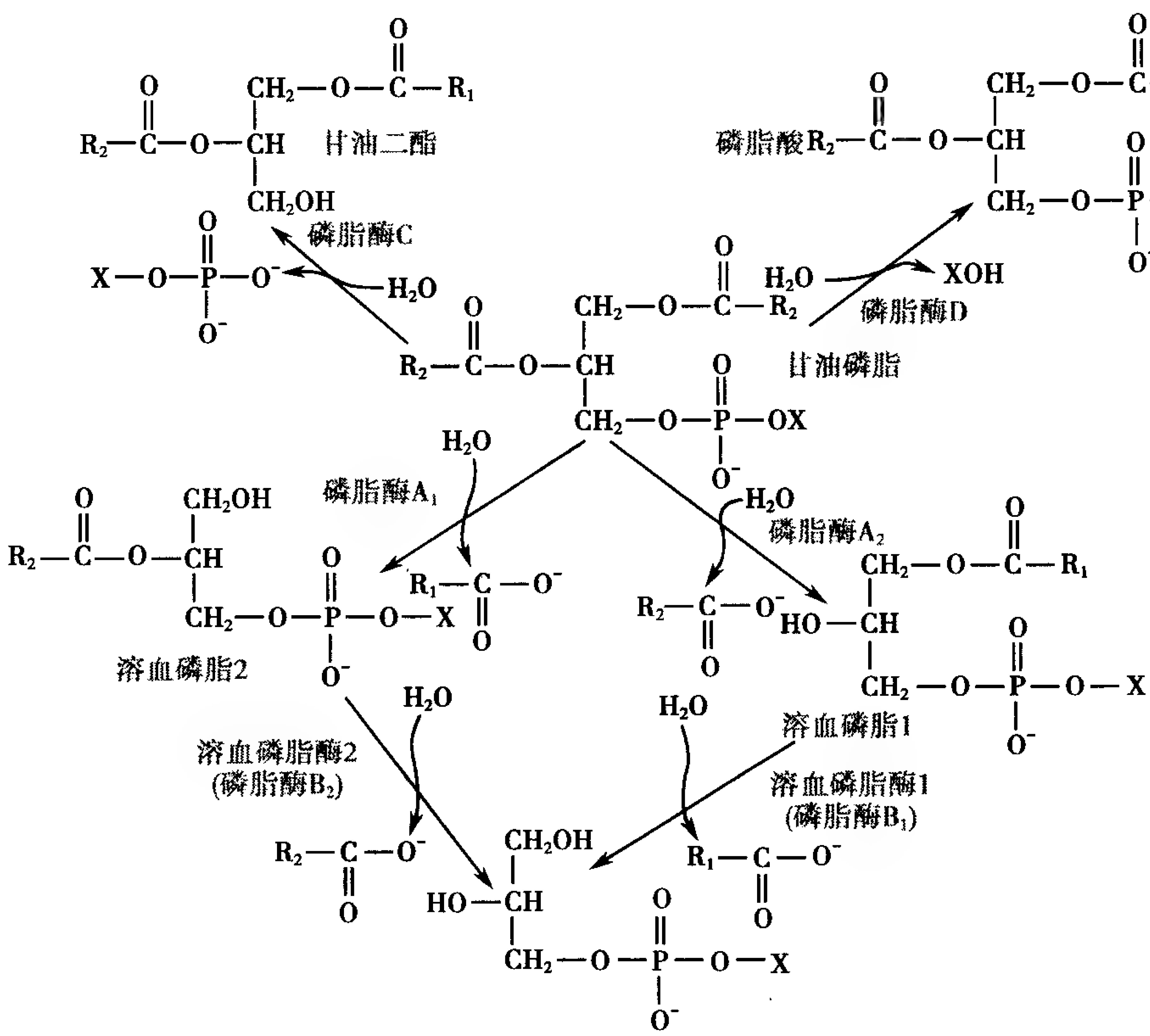
甘油磷脂的合成在内质网膜外侧面进行。最近发现，在胞液中存在一类能促进磷脂在细胞内膜之间进行交换的蛋白质，称磷脂交换蛋白（phospholipid exchange proteins），分子量在16 000～30 000之间，等电点大多在pH5.0左右。不同的磷脂交换蛋白催化不同

种类磷脂在膜之间进行交换。合成的磷脂即可通过这类蛋白的作用转移至不同细胞器膜上，从而更新磷脂。例如在内质网合成的心磷脂可通过这种方式转至线粒体内膜，而构成线粒体内膜特征性磷脂。

Ⅱ型肺泡上皮细胞可合成由 2 分子软脂酸构成的特殊磷脂酰胆碱，其 1，2 位均为软脂酰基，称为二软脂酰胆碱，是较强的乳化剂，能降低肺泡的表面张力，有利于肺泡的伸张。若新生儿肺泡上皮细胞合成障碍，则引起肺不张。

（二）甘油磷脂的降解

生物体内存在能使甘油磷脂水解的多种磷脂酶类（phospholipase），分别作用于甘油磷脂分子中不同的酯键。作用于甘油磷脂 1，2 位酯键的酶分别称为磷脂酶 A_1 及 A_2，作用于溶血磷脂 1，2 位酯键的酶称为磷脂酶 B_1 及 B_2，作用于 3 位磷酸酯键的酶称为磷脂酶 C，作用磷酸取代基间酯键的酶称为磷脂酶 D（图 5-11）。



●图 5-11　磷脂酶对磷脂的水解

X 为含氮碱

磷脂酶 A_2 存在于动物各组织的细胞膜及线粒体膜上，Ca^{2+} 为其激活剂，使甘油磷脂分子中 2 位酯键水解，产物为溶血磷脂及多不饱和脂酸（大多为花生四烯酸）。溶血磷脂是一类具较强表面活性的物质，能使红细胞膜或其他细胞膜破坏引起溶血或细胞坏死。有人认为，急性胰腺炎的发病机制与胰腺磷脂酶 A_2 对胰腺细胞膜的损伤密切相关。溶血磷脂在细胞内溶血磷脂酶 1 即磷脂酶 B_1 的作用下，水解 1 位酯键，脱下一脂酸生成不含脂酸的甘油磷酸胆碱即失去破坏细胞膜的作用，后者能进一步被磷脂酶 D 水解为磷酸甘油及含氮碱。磷脂酶 A_1 存在于动物组织溶酶体中（蛇毒及某些微生物亦含有），能水解磷脂的 1 位酯键，产生脂酸及溶血磷脂 2。磷脂酶 C 存在于细胞膜及某些细菌中，能特异水解 3 位磷酸酯键，产物为甘油二酯及磷酸胆碱或磷酸乙醇胺等。

四、鞘磷脂的代谢

（一）鞘氨醇的合成

1. 合成部位 全身各细胞均可合成，以脑组织最活跃。鞘氨醇主要在内质网合成，因其存在合成鞘氨醇的酶系。

2. 合成原料 软脂酰 CoA 及丝氨酸是合成鞘氨醇的基本原料。此外还需磷酸吡哆醛、NADPH＋H$^+$ 及 FAD 等辅酶参加。

3. 合成过程 软脂酰 CoA 与 *L*-丝氨酸在内质网 3-酮二氢鞘氨醇合成酶及磷酸吡哆醛的作用下，缩合并脱羧生成 3-酮基二氢鞘氨醇（3-ketodihydrosphingosine）；后者由 NADPH＋H$^+$ 供氢，在还原酶的催化下，加氢生成二氢鞘氨醇，然后在脱氢酶的催化下生成鞘氨醇，脱下的氢为 FAD 所接受。

（二）神经鞘磷脂的合成

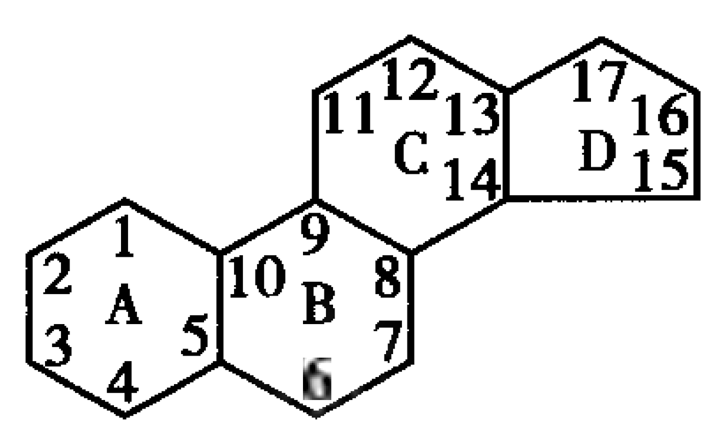
鞘氨醇在脂酰转移酶的催化下，其氨基与脂酰 CoA 进行酰胺缩合，生成 N-脂酰鞘氨醇，后者由 CDP-胆碱供给磷酸胆碱生成神经鞘磷脂。

（三）神经鞘磷脂的降解

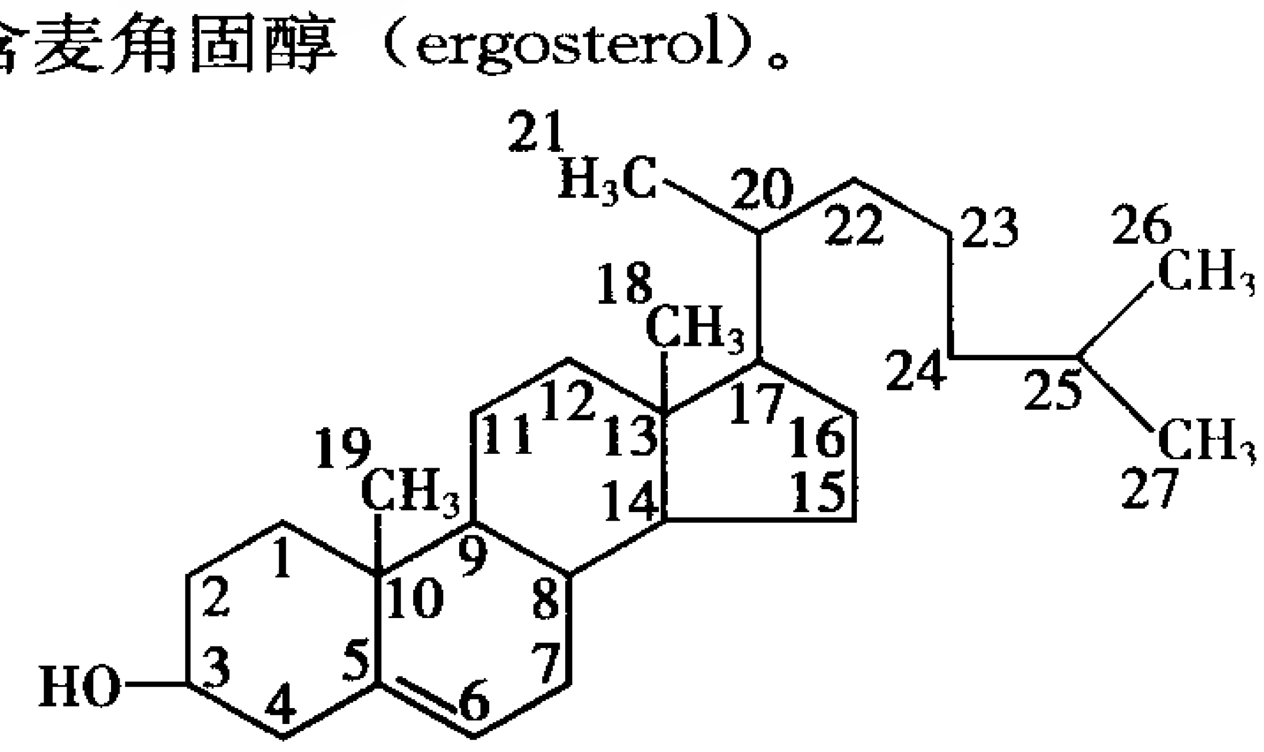
脑、肝、脾、肾等细胞的溶酶体中，有神经鞘磷脂酶（sphingomyelinase），属磷脂酶 C 类，能水解磷酸酯键，产物为磷酸胆碱及 N-脂酰鞘氨醇。若先天性缺乏此酶，则鞘磷脂不能降解而在细胞内积存，引起肝、脾大及痴呆等鞘磷脂沉积病状。

第五节 胆固醇代谢

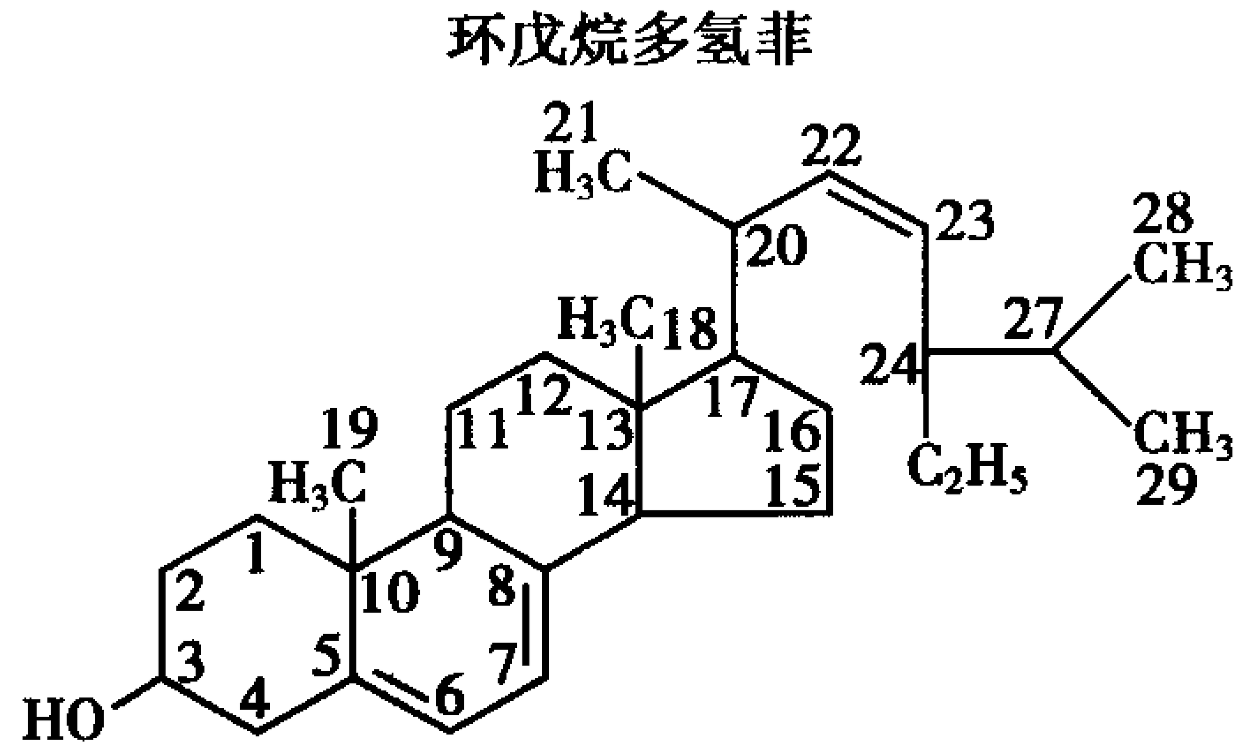
脂类的另一类形式是被称为类固醇（steroids）的化合物。它的结构与前述的甘油三酯和磷脂完全不同，以环戊烷多氢菲（cyclopentanoperhydrophenanthrene）为母体结构衍生而来。环戊烷多氢菲由 3 个己烷环和 1 个环戊烷稠合而成。不同类固醇的区别在于 C_3 羟基和 C_{17} 连接的侧链碳原子数（一般为 8～10 个碳原子）及取代基团的不同，生理功能各异。由于分子组成中含大量的碳氢、无氧或少氧而为非极性化合物。体内最丰富的类固醇化合物是胆固醇（cholesterol），C_{17} 连接 8 碳侧链。胆固醇仅存在于动物体内。植物不含胆固醇而含植物固醇，以 β-谷固醇（β-sitosterol）为最多，酵母含麦角固醇（ergosterol）。



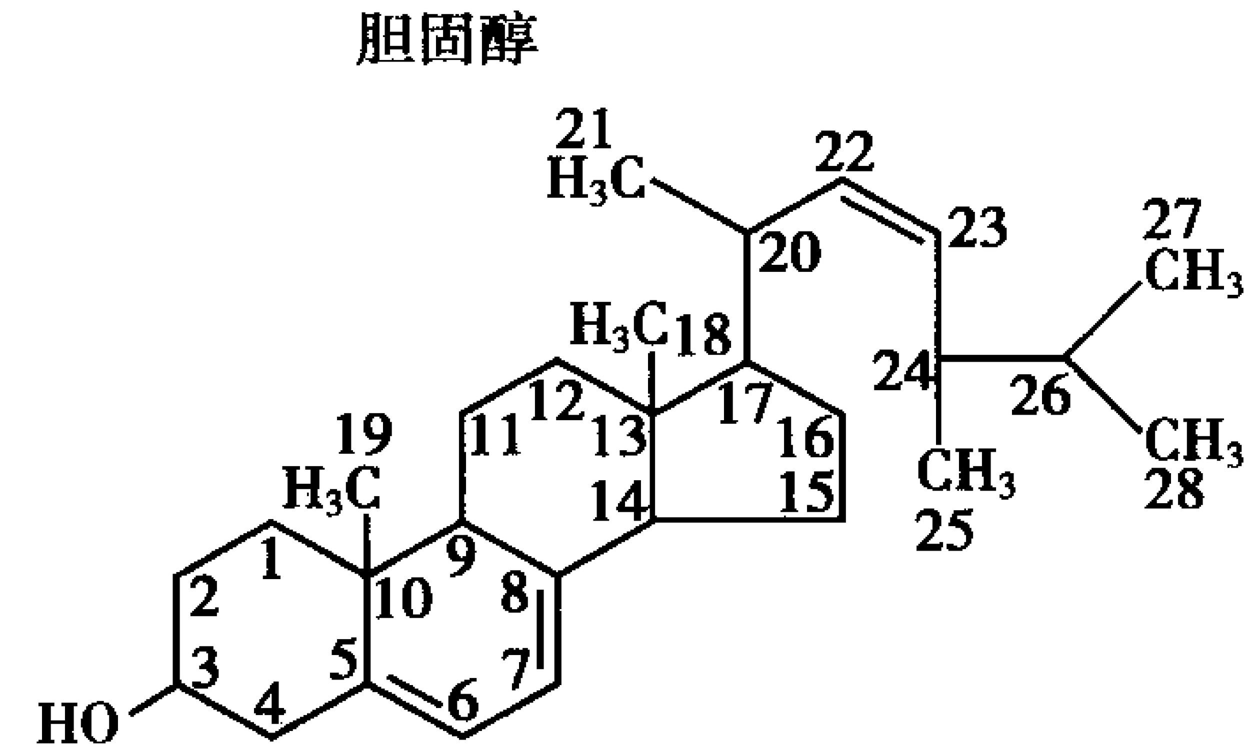
环戊烷多氢菲



胆固醇



β-谷固醇



麦角固醇

最早从动物胆石中分离出具有羟基的固醇类化合物被称为胆固醇。由于分子组成中含17个碳原子组成非极性的环戊烷多氢菲和8碳侧链烷烃（异辛烷）结构，仅含一个亲水性的羟基，因此疏水性极强，不溶于水而溶于非极性溶剂。伴随胆固醇共同存在的还有微量的二氢化物胆固烷醇（cholestanol）。因胆固醇熔点较高（149℃），在常温下以固态形式存在。人体内发现的胆石，大多数由胆固醇构成。

人体约含胆固醇140g，广泛分布于全身各组织中，大约1/4分布在脑及神经组织中，约占脑组织的2%。肝、肾、肠等内脏及皮肤、脂肪组织亦含较多的胆固醇，每100g组织约含200～500mg，其中以肝含量最多。肌组织含量较低，每100g组织约含100～200mg。肾上腺、卵巢等合成类固醇激素的内分泌腺胆固醇含量较高，达1%～5%。

胆固醇是动物细胞膜的基本结构成分之一，但细胞器（organelle）膜含量较少。因其含C_3羟基而呈微弱的亲水性，在细胞膜中以C_3羟基穿插在磷脂的极性端之间，而具疏水性的环戊烷多氢菲和C_{17}侧链与磷脂的疏水端共存在于细胞膜之中。胆固醇因含环戊烷多氢菲环使得其比细胞膜中其他脂质成分更强直（rigidity）。因此，胆固醇是决定细胞膜性质的一种重要成分。

一、胆固醇的合成原料为乙酰CoA和NADPH

（一）合成部位

除成年动物脑组织及成熟红细胞外，几乎全身各组织均可合成胆固醇，每天可合成1g左右。肝是合成胆固醇的主要场所。体内胆固醇70%～80%由肝合成，10%由小肠合成。

胆固醇合成酶系存在于胞液及光面内质网膜上，因此胆固醇的合成主要在细胞胞液及内质网中。

（二）合成原料

乙酰CoA是合成胆固醇的原料。用^{14}C及^{13}C标记乙酸的甲基碳及羧基碳，与肝切片在体外温育证明，乙酸分子中的两个碳原子均参与构成胆固醇，是合成胆固醇的唯一碳源。

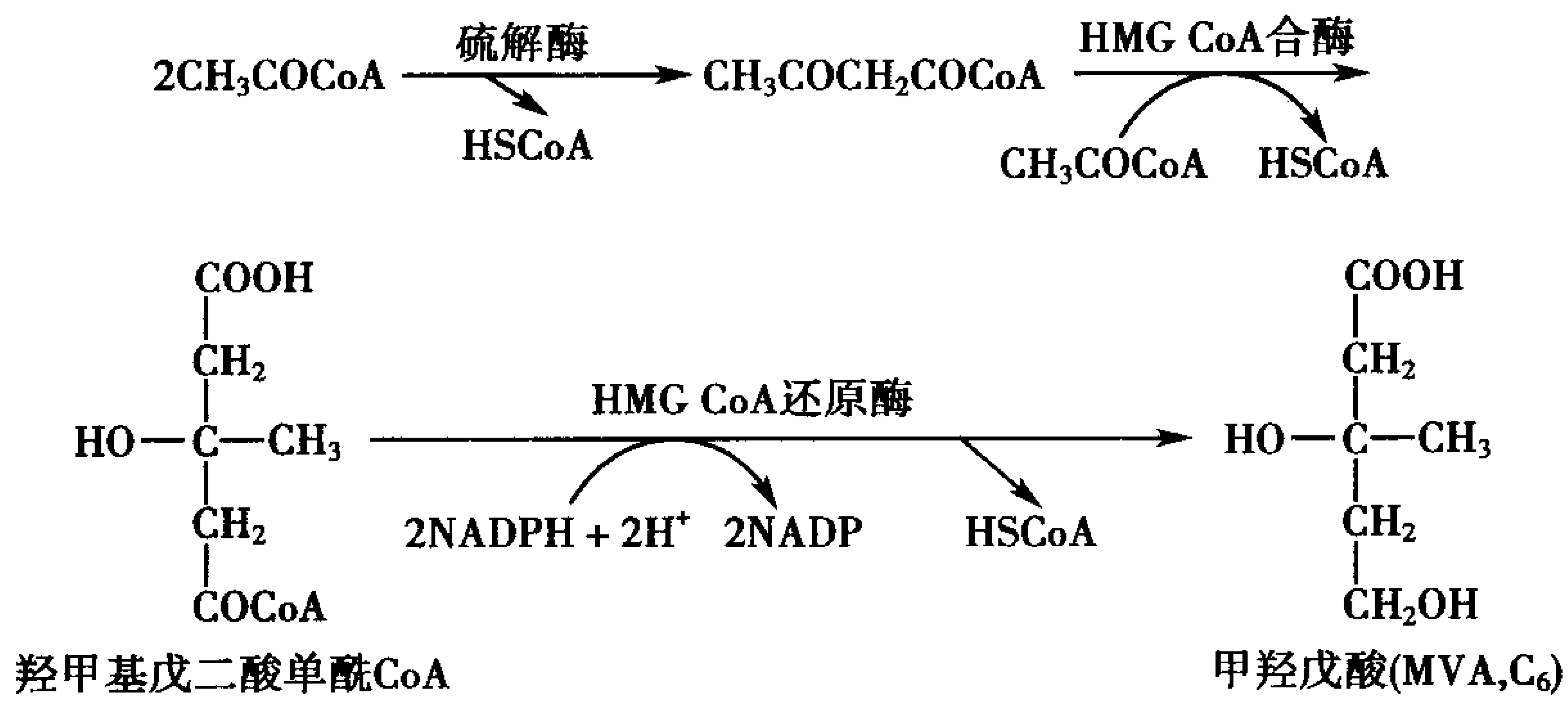
乙酰CoA是葡萄糖、氨基酸及脂酸在线粒体内的分解代谢产物。它不能通过线粒体内膜，需在线粒体内先与草酰乙酸缩合成柠檬酸，后者再通过线粒体内膜的载体进入胞液，然后柠檬酸在裂解酶的催化下，裂解生成乙酰CoA作为胆固醇的合成原料。每转运1分子乙酰CoA，由柠檬酸裂解生成乙酰CoA时要消耗1分子ATP。此外，还需要大量的$NADPH+H^+$及ATP供给合成反应所需的氢及能量。每合成1分子胆固醇需18分子乙酰CoA、36分子ATP及16分子$NADPH+H^+$。乙酰CoA及ATP大多来自糖的有氧氧化，而NADPH则主要来自磷酸戊糖途径。

（三）合成基本过程

胆固醇合成过程复杂，有近30步酶促反应，大致可划分为三个阶段。

1. 甲羟戊酸的合成 在胞液中，2分子乙酰CoA在乙酰乙酰硫解酶的催化下，缩合成乙酰乙酰CoA；然后在胞液中羟甲基戊二酸单酰CoA合酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase, HMG CoA synthase)的催化下再与1分子乙酰CoA缩合生成HMG CoA。HMG CoA是合成胆固醇及酮体的重要中间产物。在线粒体中，3分子乙酰CoA缩合成的HMG CoA裂解后生成酮体；而胞液中生成的HMG CoA，则在内质网HMG CoA还原酶(HMG CoA reductase)的催化下，由$NADPH+H^+$供氢，还原生成甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)。HMG CoA还原酶是合成胆固醇的限速酶，这步反应是合成胆固醇的限速反应。

甲羟戊酸的合成过程如下：



2. 鲨烯的合成 MVA（6 C）由 ATP 提供能量，在胞液内一系列酶的催化下，脱羧，磷酸化生成活泼的 5C 异戊烯焦磷酸（Δ^3-isopentenyl pyrophosphate，IPP）和 5C 二甲基丙烯焦磷酸（3,3-dimethylallyl pyrophosphate，DPP）。然后 3 分子活泼的 5C 焦磷酸化合物（IPP 及 DPP）缩合成 15C 的焦磷酸法尼酯（farnesyl pyrophosphate，FPP）。2 分子 15C 焦磷酸法尼酯在内质网鲨烯合酶（squalene synthase）的作用下，再缩合、还原即生成 30C 的多烯烃——鲨烯（squalene）。

3. 胆固醇的合成 鲨烯具有与固醇母核相近似的结构。鲨烯结合在胞液中固醇载体蛋白（sterol carrier protein，SCP）上，经内质网单加氧酶、环化酶等作用，环化生成羊毛固醇，后者再经氧化、脱羧，还原等反应，脱去 3 个甲基（以 CO_2 形式）生成 27C 的胆固醇（图 5-12）。

（四）胆固醇合成受多种因素调节

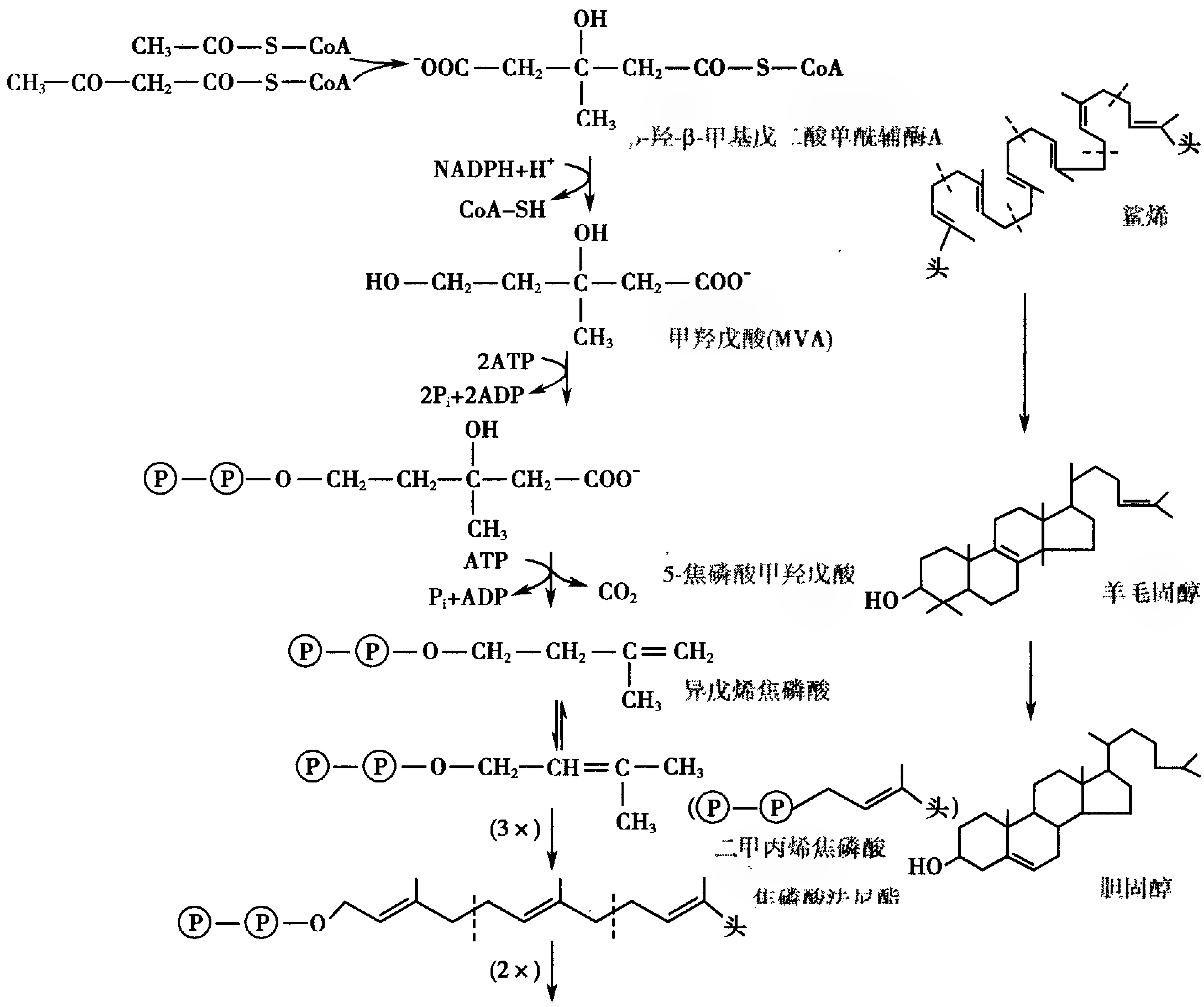
1. 限速酶 HMG CoA 还原酶是胆固醇合成的限速酶。各种因素对胆固醇合成的调节主要是通过对 HMG CoA 还原酶活性的影响来实现的。动物实验发现，大鼠肝合成胆固醇有昼夜节律性，午夜时合成最高，中午时合成最低。进一步研究发现，肝 HMG CoA 还原酶活性也有昼夜节律性，午夜酶活性最高，中午酶活性最低。由此可见，胆固醇合成的周期节律性是 HMG CoA 还原酶活性周期性改变的结果。

HMG CoA 还原酶存在于肝、肠及其他组织细胞的内质网。它是由 887 个氨基酸残基构成的糖蛋白，分子量 97000，其 N 端 35000 的结构域含疏水氨基酸较多，跨内质网膜固定在膜上，C 端 62000 亲水的结构域则伸向胞液，具催化活性。胞液中有依赖于 AMP 蛋白激酶，在 ATP 存在下，可使 HMG CoA 还原酶磷酸化而丧失活性。胞液中的磷蛋白磷酸酶可催化 HMG CoA 还原酶脱磷酸而恢复酶活性。某些多肽激素如胰高血糖素能快速抑制 HMG CoA 还原酶的活性而抑制胆固醇的合成，可能是该酶磷酸化失活的结果。

2. 饥饿与饱食 饥饿与禁食可抑制肝合成胆固醇。大鼠禁食 48 小时，胆固醇的合成减少 11 倍，禁食 96 小时减少 17 倍，而肝外组织的合成减少不多。禁食除使 HMG CoA 还原酶合成减少、活性降低外，乙酰 CoA、ATP、NADPH＋H^+ 的不足也是胆固醇合成减少的重要原因。相反，摄取高糖、高饱和脂肪膳食后，肝 HMG CoA 还原酶活性增加，胆固醇的合成增加。

3. 胆固醇 胆固醇主要通过抑制 HMG CoA 还原酶的合成，反馈抑制肝胆固醇的合成。HMG CoA 还原酶在肝的半寿期约 4 小时，如酶的合成被阻断，则肝细胞内酶含量在几小时内便降低。反之，降低食物胆固醇量，对酶合成的抑制解除，胆固醇合成增加。此外还发现，胆固醇的氧化产物如 7β-羟胆固醇，25 羟胆固醇对 HMG CoA 还原酶有较强的抑制作用。胆固醇的抑制作用是否与此有关尚未阐明。

4. 激素 胰岛素及甲状腺素能诱导肝 HMG CoA 还原酶的合成，从而增加胆固醇的



● 图 5-12　胆固醇的生物合成

合成。胰高血糖素及皮质醇则能抑制并降低 HMG CoA 还原酶的活性，因而减少胆固醇的合成。甲状腺素除能促进 HMG CoA 还原酶的合成外，同时又促进胆固醇在肝转变为胆汁酸，且后一作用较前者强，因而甲状腺功能亢进时患者血清胆固醇含量反而下降。

胆固醇和脂肪代谢的机制和条件

美国哈佛大学 K. Bloch（布洛赫）教授和德国慕尼黑马克斯—普朗克细胞化学研究所 F. Lynen（吕南）教授因发现了“胆固醇和脂肪代谢的机制和调节”而获得 1964 年诺贝尔生理医学奖。主要工作为：吕南教授成功地分离出一种所谓的活化乙酸，发现它是人体内所有脂质的前体（包括胆固醇和脂肪），而且也是很多代谢过程的共同物质。布洛赫教授和合作者尽可能巧妙地应用了同位素技术，证实了如何利用乙酸的两个碳原子合成具有 30 个碳原子的类固醇——羊毛固醇。这种羊毛固醇经过一系列复杂的反应转变成具有 27 个碳原子的胆固醇。他们的基础生化研究使人们详细知道了人体内的胆固醇和脂酸是如何合成和进行代谢的。布洛赫教授还发现了胆固醇是胆酸和一种雌激素的前体。并为进一步研究打下良好的基础。如随后的研究发现人体内所有天然的类固醇物质，都是由胆固醇形成的；在很多情况下，正是由于脂质形成和代谢的这种复杂机制发生了混乱，结果导致了一些最严重的疾病（尤其是心血管疾病）。

二、转化成胆汁酸及类固醇激素是体内胆固醇的主要去路

胆固醇的母核 环戊烷多氢菲在体内不能被降解，但它的侧链可被氧化、还原或降解转变为其他具有环戊烷多氢菲母核的生理活性化合物，参与调节代谢或排出体外。

（一）胆固醇可转变为胆汁酸

胆固醇在体内代谢的主要去路是在肝细胞中转化成胆汁酸（bile acid），随胆汁经胆管排入十二指肠。正常人每天约合成 1～1.5g 胆固醇，其中 2/5（0.4～0.6g）在肝中转化为胆汁酸，随胆汁排入肠道，具有促进脂类消化与吸收、抑制胆汁中胆固醇的析出等作用。

（二）胆固醇可转化为类固醇激素

胆固醇是类固醇激素的前体。体内一些内分泌腺，如肾上腺皮质、睾丸、卵巢等以储存在其胞内的胆固醇（酯）为原料合成和分泌相应的类固醇激素（见表 5-4），在调节生理和导致病理过程中起着十分重要的作用。

表 5-4 人体内利用胆固醇为原料合成的主要类固醇激素

[illegible]	器 官	合成的类固醇激素	[illegible]	器 官	合成的类固醇激素
肾上腺			睾丸		
	皮质球状带	醛固酮		间质细胞	睾丸酮
	皮质束状带	皮质醇	卵巢		
	皮质网状带	雄激素		卵泡内膜细胞	雌二醇、孕酮
				黄体	

（三）胆固醇可转化为维生素 D_3 的前体

维生素 D 前体和胆固醇的化学结构中均有环戊烷多氢菲。维生素 D 前体为胆固醇在皮肤下被氧化生成的 7-脱氢胆固醇。维生素 D 前体经紫外线照射后，其 B 环（C_9-C_{10}）开环成为维生素 D_3 又称胆钙化［甾］醇（cholecalciferol）。

第六节 血浆脂蛋白代谢

一、血脂是血浆所含脂类的统称

血浆所含脂类统称为血脂，包括甘油三酯、磷脂、胆固醇及其酯、游离脂酸等。磷脂主要有卵磷脂（约 70%）、神经鞘磷脂（约 20%）及脑磷脂（约 10%）。血脂的来源有二：一为外源性，从食物摄取的脂类经消化吸收进入血液；二是内源性，由肝、脂肪细胞以及其他组织合成后释放入血。血脂含量不如血糖恒定，受膳食、年龄、性别、职业以及代谢等的影响，波动范围较大。正常成年人空腹 12～14 小时血脂的组成及含量见表 5-5。

二、不同血浆脂蛋白其组成、结构均不同

脂类不溶于水，在水中呈乳浊液。而正常人血浆含脂类虽多，却仍清澈透明，说明血脂在血浆中不是以游离状态存在，而与血浆中某种物质结合，以可溶性形式存在。血浆脂类物质主要与载脂蛋白等结合形成脂蛋白而可溶，并以脂蛋白形式运输。从脂肪组织动员释放入血的游离脂酸，亦不溶于水，常与血浆中的清蛋白结合而运输，不列入血浆脂蛋白内。

表 5-5　正常成人空腹血脂的组成及含量

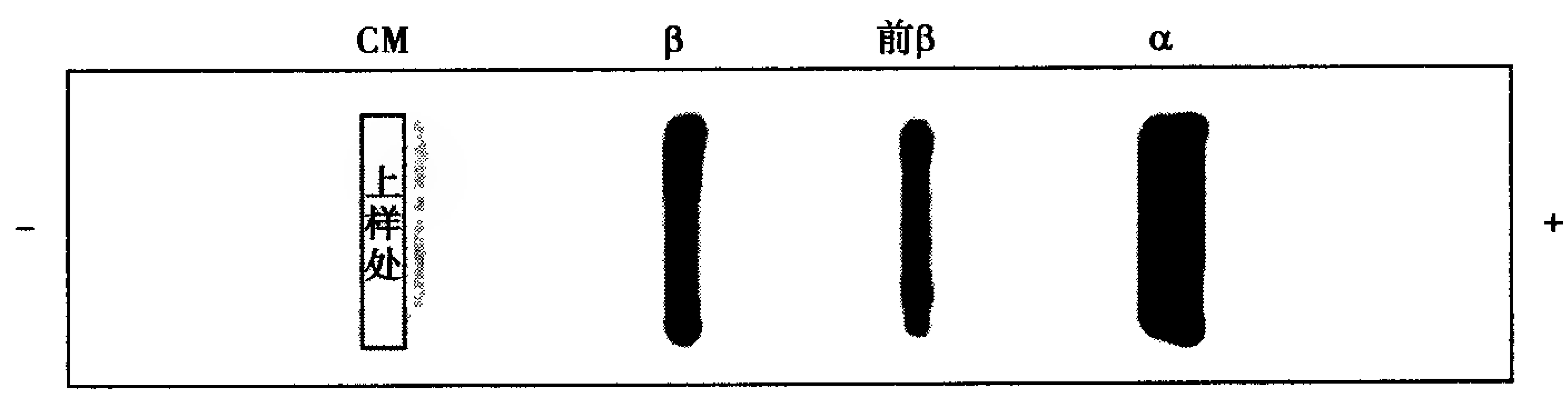
组　成	血浆含量		空腹时主要来源
	mg/mL	mmol/L	
总脂	400～700 (500)		
甘油三酯	10～150 (100)	0.11～1.69 (1.13)	肝
总胆固醇	100～250 (200)	2.59～6.47 (5.17)	肝
胆固醇酯	70～250 (200)	1.81～5.17 (3.75)	
游离胆固醇	40～70 (55)	1.03～1.81 (1.42)	
总磷脂	150～250 (200)	48.44～80.73 (64.58)	肝
卵磷脂	50～200 (100)	16.1～64.6 (32.3)	肝
神经磷脂	50～130 (70)	16.1～42.0 (22.6)	肝
脑磷脂	15～35 (20)	4.8～13.0 (6.4)	肝
游离脂酸	5～20 (15)		脂肪组织

注：括号内为均值

（一）血浆脂蛋白的分类

各种脂蛋白因所含脂类及蛋白质的不同，其密度、颗粒大小、表面电荷、电泳行为及免疫性均有所不同。用电泳法及超速离心法可分别将血浆脂蛋白分为四类。

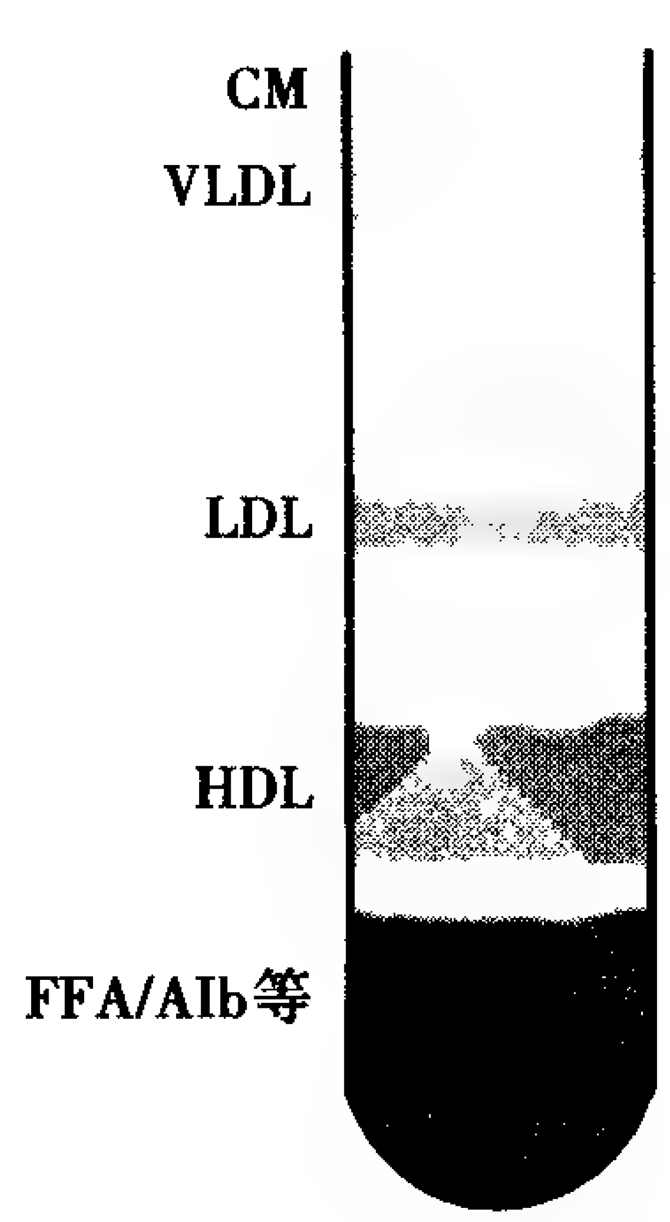
1. 电泳法　电泳法主要根据不同脂蛋白的表面电荷不同，在电场中具不同的迁移率，按其在电场中移动的快慢，可分为 α、前 β、β 脂蛋白和 CM 四类。一般常用滤纸、醋酸纤维素膜、琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶作为电泳支持物（图 5-13）。



●图 5-13　血浆脂蛋白琼脂糖凝胶电泳示意图

α-脂蛋白泳动最快，相当于 α1-球蛋白的位置；β-脂蛋白相当于 β-球蛋白的位置；前 β 位于 β-脂蛋白之前，相当于 α2-球蛋白的位置；血浆中若含有 CM，则留在原点不动。

2. 超速离心法　由于各种脂蛋白含脂类及蛋白质各不相同，因而其密度各不相同。血浆在一定密度的盐溶液中进行超速离心时，其所含脂蛋白因密度不同或漂浮或沉降，可分为 CM，因其含脂最多，密度小于 0.95，易于上浮而出现在离心管的上部；其余的按密度大小依次为 VLDL、低密度脂蛋白（low density lipoprotein，LDL）和高密度脂蛋白（high density lipoprotein，HDL）（图 5-14）。分别相当于电泳分离的 CM、前 β-脂蛋白、β-脂蛋白及 α-脂蛋白等四类。通常用 Svedberg 漂浮率（S）表示其上浮情况。血浆脂蛋白在密度为 1.063 的 NaCl 溶液中，26℃下，每秒每达因克离心力的力场下，每上浮 10^{-13} cm 即为 $1S_f$ 单位，即 $1S_f = 10^{-13}$ cm/s · dyn · g。



●图 5-14　超速离心分离血浆脂蛋白示意图

除上述四类脂蛋白外，还有中密度脂蛋白（intermediate density lipoprotein，IDL），它是 VLDL 在血浆中的代谢物，其组成及密度介于 VLDL 及 LDL 之间，密度为 1.006～1.019（表 5-6）。

表 5-6 血浆脂蛋白的分类、性质、组成及功能

分类	密度法 电泳法	乳糜微粒	极低密度脂蛋白 前β-脂蛋白	低密度脂蛋白β-脂蛋白	高密度脂蛋白α-脂蛋白
性质	密度	<0.95	0.95～1.006	1.006～1.063	1.063～1.210
	S_f 值	>400	20～400	0～20	沉降
	电泳位置	原点	α_2-球蛋白	β-球蛋白	α_1-球蛋白
	颗粒直径（nm）	80～500	25～80	20～25	5～17
组成（%）	蛋白质	0.5～2	5～10	20～25	50
	脂质	98～99	90～95	75～80	50
	甘油三酯	80～95	50～70	10	5
	磷脂	5～7	15	20	25
	胆固醇	1～4	15	45～50	20
	游离胆固醇	1～2	5～7	8	5
	胆固醇酯	3	10～12	40～42	15～17
载脂蛋白组成（%）	apo AⅠ	7	<1	—	65～70
	Apo AⅡ	5			20～25
	Apo AⅣ	10	—	—	—
	Apo B_{100}	—	20～60	95	—
	Apo B_{48}	9	—	—	—
	Apo CⅠ	11	3	—	6
	Apo CⅡ	15	6	微量	1
	Apo CⅢ$_{0\sim2}$	41	40	—	4
	Apo E	微量	7～15	<5	2
	Apo D	—	—	—	3
主要合成部位		小肠黏膜细胞	肝细胞	血浆	肝、肠、血浆
功能		转运外源性甘油三酯和胆固醇	转运内源性甘油三酯和胆固醇	转运内源性胆固醇	逆向转运胆固醇（从肝外组织至肝细胞）

（二）血浆脂蛋白的组成

血浆脂蛋白主要由蛋白质、甘油三酯、磷脂、胆固醇及其酯组成。各类脂蛋白都含有这四类成分，但其组成比例及含量却大不相同。各种脂蛋白的密度大小与其组成中的蛋白质比例相关。

（三）载脂蛋白

血浆脂蛋白中的蛋白质部分被称为 apo，迄今为止已从人血浆中分离出的 apo 有 20 种之多。主要有 apoA、apoB、apoC、apoD 及 apoE 等五类，其中 apoA 又分为 AⅠ、AⅡ、AⅣ及 AⅤ；apoB 又分为 B_{100} 及 B_{48}；apoC 又分为 CⅠ、CⅡ、CⅢ及 CⅣ。不同脂蛋白含不同的载脂蛋白。如 HDL 主要含 apoAⅠ及 apoAⅡ；LDL 几乎只含 apoB_{100}；VLDL 除含 apoB_{100} 以外，还有 apoCⅠ、apoCⅡ、apoCⅢ及 apoE；CM 含 apoB_{48} 而不含 apoB_{100}。人几种主要载脂蛋白的基因结构、染色体定位、氨基酸序列均已确定。1986 年通过 cDNA 序列分析，确定了 apoB_{100} 的氨基酸组成及序列，证明 apoB_{100} 是由 4536 个氨基酸残基构成的单链多肽，分子量为 512723，是迄今世界上阐明一级结构的分子量最大的蛋白质（表 5-7）。

表 5-7　人血浆载脂蛋白的结构、功能及含量

载脂蛋白	分子量	氨基酸数	分　布	功　能	血浆含量（mg/dl）*
AⅠ	28300	243	HDL，CM	激活 LCAT，识别 HDL 受体	123.8±4.7
AⅡ	17000	77×2	HDL	稳定 HDL 结构，激活 HL	33±5
AⅥ	46 000	371	HDL，CM	辅助激活 LPL	17±2▲
B_{100}	512723	4,536	VLDL，LDL	识别 LDL 受体	87.3±14.3
B_{48}	264000	2,152	CM	促进 CM 合成	?
CⅠ	6500	57	CM，VLDL，HDL	激活 LCAT?	7.8±2.4
CⅡ	8800	79	CM，VLDL，HDL	激活 LPL	5.0±1.8
CⅢ	8900	79	CM，VLDL，HDL	抑制 LPL，抑制肝 apoE 受体	11.8±3.6
D	22000	169	HDL	转运胆固醇酯	10±4▲
E	34000	299	CM，VLDL，HDL	识别 LDL 受体	3.5±1.2
J	70000	427	HDL	结合转运脂质，激活补体	10▲
(a)	500000	4,529	LP（a）	抑制纤溶酶活性	0～120▲
CETP	64000	493	HDL，d>1.21	转运胆固醇酯	0.19±0.05▲
PTP	69000	?	HDL，d>1.21	转运磷脂	?

* 四川大学华西基础医学与法医学院生物化学与分子生物学教研室载脂蛋白研究室对成都地区 625 例正常成人的测定结果

▲国外报道参考值

CETP：胆固醇酯转运蛋白；LPL：脂蛋白脂酶；PTP：磷脂转运蛋白；HL：肝脂酶

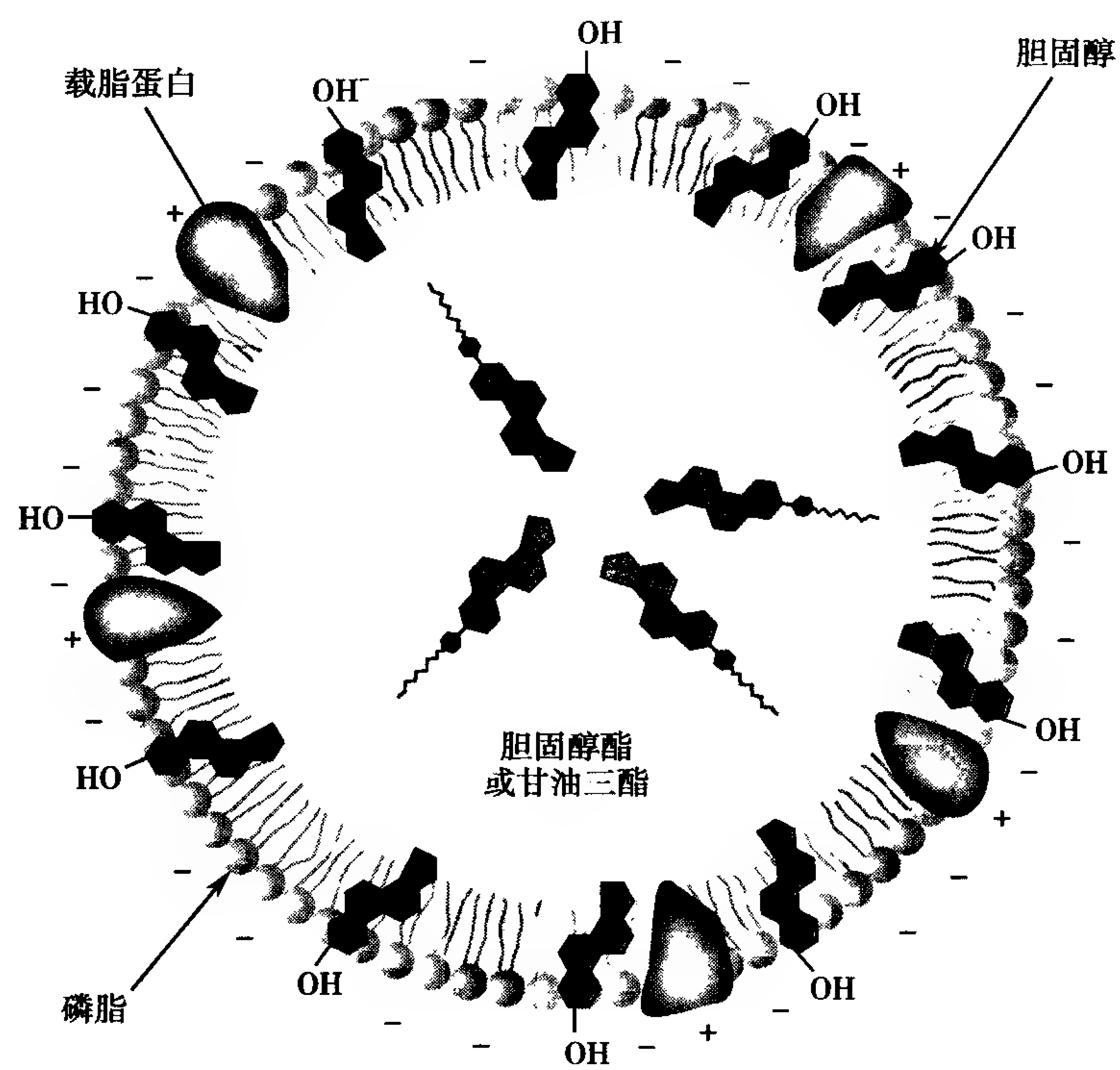
近年来的研究表明，载脂蛋白不仅在结合和转运脂质及稳定脂蛋白的结构上发挥着重要作用，而且还调节脂蛋白代谢关键酶活性，参与脂蛋白受体的识别，在脂蛋白代谢上发挥着极为重要的作用（表 5-8）。

表 5-8　脂蛋白代谢关键酶的性质、分布及功能

关键酶	脂蛋白脂酶（LPL）	肝脂酶（HL）	胆固醇脂酰转移酶（LCAT）
底物	CM-TG，VLDL-TG	VLDL-，LDL-，及 HDL-TG	HDL-卵磷脂，胆固醇
最适 pH	7.5～9.0	7.5～9.0	7.4
分布	肝外组织：脂肪、心肌、肺、乳腺等	肝实质性细胞合成，转运至肝窦内皮细胞	肝实质性细胞合成，分秘入血
作用部位	毛细血管内皮细胞表面	肝窦内皮细胞	血浆
激活剂	apoCⅡ	不需要 apoCⅡ激活	apoAⅠ
抑制剂	FFA、鱼精蛋白、1mol/L NaCl、apoCⅢ	不被鱼精蛋白、1mol/L NaCl、apoCⅢ抑制	—
结构	由 448 个氨基酸残基构成，分子量 61kD	由 476 个氨基酸残基构成，分子量 51kD	由 416 个氨基酸残基构成，分子量 61kD
基因	长 30kb，含 10 个外显子，11 个内含子	—	6 个外显子，5 个内含子，mRNA 长 1.55kb
染色体定位	8 号染色体	15 号染色体	16 号染色体（$16q^{22}$）
功能	催化 CM、VLDL 内核 TG 水解，生成的 FFA 供肝外组织利用	催化 HDL 内核 TG 水解，使 HDL_2 转变为 HDL_3；催化 IDL 内核 TG 水解，使 IDL 转变为 LDL	促进新生 HDL 成熟转变为 HDL_2；HDL_2 促进胆固醇逆向转运

（四）脂蛋白的结构

血浆各种脂蛋白具有大致相似的基本结构（图 5-15）。疏水性较强的甘油三酯及胆固醇酯均位于脂蛋白的内核，而具极性及非极性基团的载脂蛋白、磷脂及游离胆固醇则以单分子层借其非极性的疏水基团与内部的疏水链相联系，覆盖于脂蛋白表面，其极性基团朝外，呈球状。大多数载脂蛋白如 apo AⅠ、apoAⅡ、apoCⅠ、apoCⅡ、apoCⅢ及 apoE 等均具双性 α-螺旋（amphipathic α-helix）结构。不带电荷的疏水性氨基酸残基构成 α-螺旋的非极性面，带电荷的亲水性氨基酸残基构成 α-螺旋的极性面，这种双性 α-螺旋结构有利于载脂蛋白与脂质的结合并稳定脂蛋白的结构。CM 及 VLDL 主要以甘油三酯为内核，LDL 及 HDL 则主要以胆固醇酯为内核。HDL 的蛋白质/脂类比值最高，故大部分表面被蛋白质分子所覆盖，并与磷脂交错穿插。



●图 5-15 血浆脂蛋白结构示意图

三、血浆脂蛋白是血脂的运输形式，但代谢和功能各异

（一）乳糜微粒

CM 由小肠黏膜细胞合成，是外源性甘油三酯及胆固醇的主要运输形式。CM 的功能为运输外源性甘油三酯至骨骼肌、心肌、脂肪等组织，运输外源性胆固醇至肝。脂肪消化吸收时，小肠黏膜细胞再合成的甘油三酯，连同合成及吸收的磷脂及胆固醇，与 $apoB_{48}$、apoAⅠ、apoAⅡ、apoAⅣ等结合形成新生的 CM。新生 CM 经淋巴管进入血液，从 HDL 获得 apo C 及 apoE，并将部分 apo AⅠ、apoAⅡ、apoAⅣ转移给 HDL，形成成熟的 CM。新生 CM 获得 apo C 后，其中的 apo CⅡ激活骨骼肌、心肌及脂肪等组织毛细血管内皮细胞表面的 LPL。LPL 催化 CM 中的甘油三酯及磷脂逐步水解，产生甘油、脂酸及溶血磷脂等。apoCⅡ是 LPL 不可缺少的激活剂。无 apo CⅡ时，LPL 活性很低，加入 apo CⅡ

后，其活性可增加 10～50 倍。在 LPL 的反复作用下，CM 内核的甘油三酯 90%以上被水解，释出的脂酸被心、肌、脂肪及肝组织摄取利用，同时其表面的 apoAⅠ、apoAⅣ、apoAⅡ、apoC 等连同表面的磷脂及胆固醇离开 CM 颗粒，形成新生的 HDL；CM 颗粒逐步变小，最后转变成为富含胆固醇酯（cholesterol ester，CE）、$apoB_{48}$及 apoE 的 CM 残粒（remnant），后者与肝细胞膜 LDL 受体相关蛋白（LDL receptor related protein，LRP）结合并被肝细胞摄取代谢。正常人 CM 在血浆中代谢迅速，半寿期为 5～15 分钟，因此空腹 12～14 小时后血浆中不含 CM。

（二）极低密度脂蛋白

VLDL 主要由肝细胞合成，是运输内源性甘油三酯的主要形式。肝细胞可以葡萄糖为原料合成甘油三酯，也可利用食物及脂肪动员的脂酸合成脂肪，与 $apoB_{100}$、apoE 以及磷脂、胆固醇等结合形成 VLDL。此外，小肠黏膜细胞亦可合成少量 VLDL。VLDL 的代谢与 CM 基本一致，分泌入血后，从 HDL 获得 apoC，其中的 apoCⅡ激活肝外组织毛细血管内皮细胞表面的 LPL。在 LPL 作用下，VLDL 的甘油三酯被逐步水解，同时其表面的 apoC、磷脂及胆固醇向 HDL 转移，而 HDL 的胆固醇酯又转移到 VLDL。VLDL 本身颗粒逐渐变小，其密度逐渐增加，$apoB_{100}$及 apoE 的含量相对增加，转变 IDL。IDL 中胆固醇及甘油三酯含量大致相等，载脂蛋白则主要是 $apoB_{100}$及 apoE。肝细胞膜 LRP 可与 IDL 结合，因此部分 IDL 为肝细胞摄取代谢。未被肝细胞摄取的 IDL（人约 50%）甘油三酯被 LPL 及肝脂酶（heptic lipase，HL）进一步水解，最后只剩下 CE，同时其表面的 apoE 转移至 HDL，仅剩下 $apoB_{100}$，IDL 即转变为 LDL。VLDL 在血中的半寿期为 6～12 小时。

（三）低密度脂蛋白（LDL）

LDL 主要由 VLDL 在人血浆中转变而来，是转运肝合成的内源性胆固醇的主要形式。利用 ^{14}C-蔗糖-LDL 证明，肝是降解 LDL 的主要器官，约 50%的 LDL 在肝降解。肾上腺皮质、卵巢、睾丸等组织摄取及降解 LDL 的能力亦较强。业已证明，LDL 是通过细胞膜表面能特异结合 LDL 的 LDL 受体而摄取和降解的。

LDL 受体广泛存在于肝、动脉壁细胞等全身各组织的细胞膜表面，能特异识别与结合含 apoE 或 apo B_{100}的脂蛋白，故又称 apo B，E 受体。当血浆中的 LDL 与 LDL 受体结合后，则受体聚集成簇，内吞入细胞与溶酶体融合。在溶酶体蛋白水解酶作的用下，LDL 中的 apo B_{100}水解为氨基酸，其中的 CE 被胆固醇酯酶水解为游离胆固醇（free cholesterol，FC）及脂酸。

FC 为细胞膜摄取，是构成细胞膜的重要成分。在肾上腺、卵巢及睾丸等细胞中则用以合成类固醇激素。上述血浆中 LDL 与细胞 LDL 受体结合后的一系列过程称为 LDL 受体代谢途径。LDL 被细胞摄取量的多少，取决于细胞膜上受体的多少。肝、肾上腺皮质、性腺等组织 LDL 受体数目较多，故摄取 LDL 亦较多。

FC 在调节细胞胆固醇代谢上具有重要作用：①抑制内质网 HMG CoA 还原酶，从而抑制细胞本身胆固醇合成；②在转录水平阻抑细胞 LDL 受体蛋白质的合成，减少细胞对 LDL 的进一步摄取；③激活内质网脂酰 CoA 胆固醇脂酰转移酶（acyl coenzyme A-cholesterol acyltransferase，ACAT）的活性，使游离胆固醇酯化成胆固醇酯在胞液中储存。

除 LDL 受体代谢途径外，血浆中的 LDL 还可被修饰，修饰的 LDL 如氧化修饰 LDL（oxidized LDL，oxLDL）可被单核-吞噬细胞系统中的巨噬细胞及血管内皮细胞清除。这两类细胞膜表面具有清道夫受体（scavenger receptor，SR），可与修饰 LDL 结合而摄取清除血浆中的修饰 LDL。正常人血浆 LDL 每天降解量占总量的 45%，其中 2/3 由 LDL 受体

途径降解，1/3 由清除细胞清除。LDL 在血浆中的半寿期为 2～4 天。

(四) 高密度脂蛋白

HDL 主要由肝合成，小肠亦可合成部分，主要功能是参与胆固醇的逆向转运（reverse cholesterol transport，RCT），即将胆固醇从肝外组织转运至肝。此外，当 CM 及 VLDL 中的甘油三酯水解时，其表面的 apoAⅠ、apoAⅡ、apoAⅣ、apoC 以及磷脂，胆固醇等脱离 CM 及 VLDL 亦可形成新生 HDL。HDL 按密度大小又分为 HDL_1、HDL_2 及 HDL_3。HDL_1 又称为 HDL_C，仅在摄取高胆固醇膳食才在血中出现，正常人血浆中主要含 HDL_2 及 HDL_3。

HDL 的 RCT 是将肝外组织细胞内的胆固醇，经血循环转运到肝，在肝转化为肝汁酸后排出体外。RCT 的第一步是胆固醇从肝外细胞包括动脉平滑肌细胞及巨噬细胞等移出，HDL 是不可缺少的接受体（acceptor）。随血液流经组织的富含磷脂及 apoAⅠ、含 FC 较少的新生 HDL 能作为 FC 接受体促进细胞胆固醇的外流。巨噬细胞、脑、肾、肠及胎盘等的细胞膜存在 ATP 结合转运蛋白 A_1（ATP-binding cassette transporter A_1，$ABCA_1$），又称为胆固醇流出调节蛋白（cholesterol-efflux regulatory protein，CERP），是 ABC 转运蛋白超家族的成员，由 2261 个氨基酸构成的跨膜蛋白。$ABCA_1$ 具有 4 个结构域，其中 2 个结构域为跨膜域，含有由 12 个疏水的模体构成的疏水区，胆固醇可能由此流出胞外；另外 2 个结构域为伸向细胞质的 ATP 结合部位，它能为胆固醇的跨膜转运提供能量。$ABCA_1$ 可介导细胞内胆固醇及磷脂转运至胞外，在 RCT 中发挥重要作用。

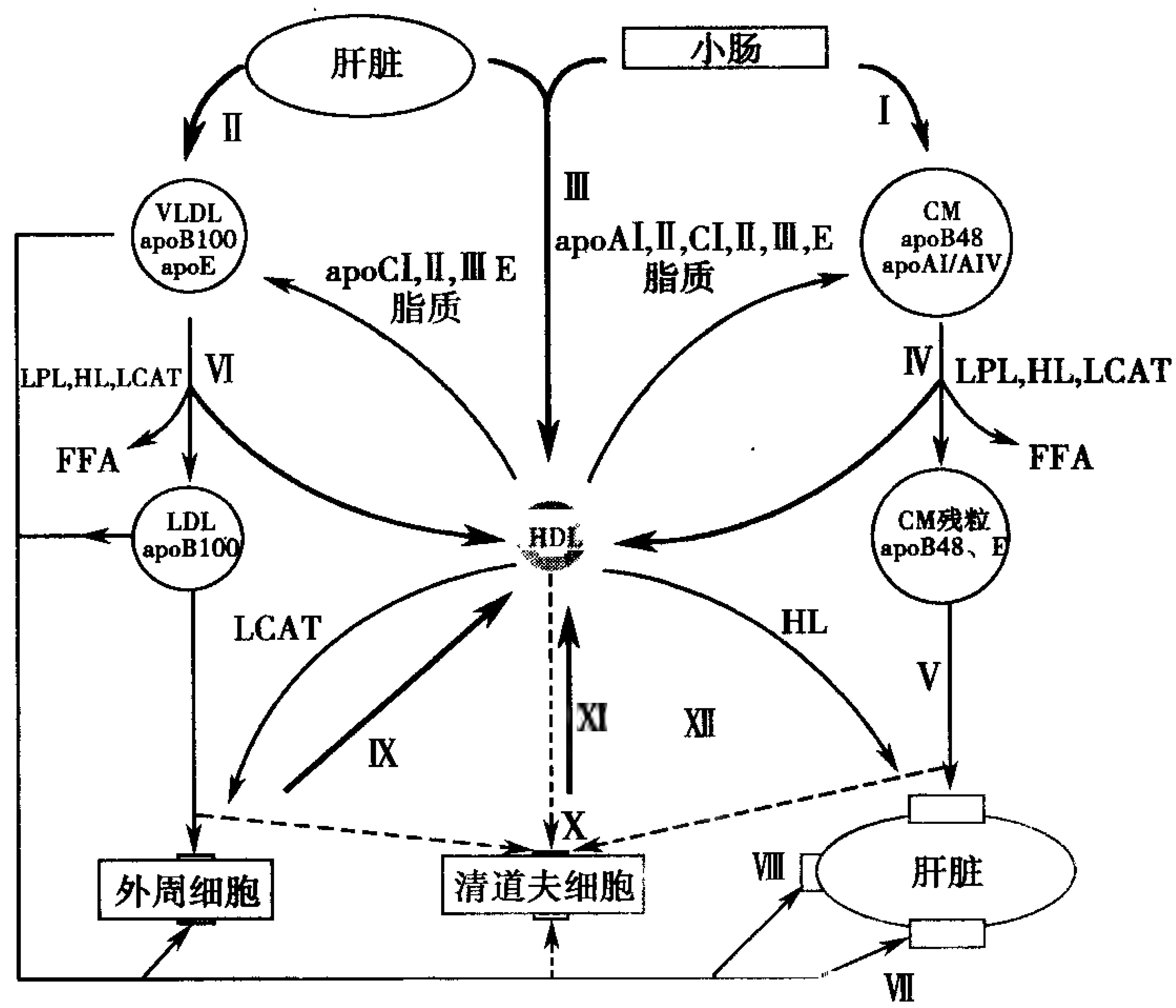
RCT 的第二步是 HDL 载运胆固醇的酯化以及 CE 的转运。刚从肝或小肠分泌或 CM 水解时形成的新生 HDL 均呈盘状。新生 HDL 进入血液后，在血浆卵磷脂胆固醇脂酰转移酶（lecithin cholesterol acyltransferase，LCAT）的催化下，HDL 表面卵磷脂的 2 位脂酰基转移至胆固醇 3 位羟基生成溶血卵磷脂及 CE。此过程消耗的卵磷脂及 FC 不断从肝外细胞得到补充。LCAT 由肝实质细胞合成，分泌入血，在血浆中发挥作用。HDL 表面的 apoAⅠ是 LCAT 的激活剂，它可能是 FC 的接受体，能增加 LCAT 的催化活性。在 LCAT 的作用下生成的 CE 转运入 HDL 的核心。新生 HDL 的 FC 在 LCAT 的反复作用下，生成的 CE 增多，因此进入 HDL 内核的 CE 逐渐增多，使双脂层的盘状 HDL 被逐步膨胀为单脂层的球状 HDL，同时其表面的 apoC 及 apoE 又转移到 CM 及 VLDL 上，最后新生 HDL 转变为成熟 HDL。

RCT 的最终步骤在肝内进行的。肝是机体清除胆固醇的主要器官。肝细胞膜存在 HDL 受体（HDL recepter）、LDL 受体及特异的 apoE 受体。最近研究表明，血浆中 90% 以上的 CE 来自 HDL，其中约 70%的 CE 在 CETP 作用下由 HDL 转移至 VLDL 及 LDL 后由肝 LDL 受体结合摄取清除，20%则通过肝的 HDL 受体清除，10%由特异的 apoE 受体清除。被肝摄取的胆固醇可用以合成胆汁酸或直接通过胆汁排出体外。HDL 在血浆中的半寿期为 3～5 天。

由此可见，HDL 在 LCAT、apoAⅠ及 CETP 等的作用下，可将胆固醇从肝外组织转运到肝进行代谢。机体可通过 RCT，将外周组织中衰老细胞膜中的胆固醇转运至肝代谢并排出体外。

HDL 也是 apoCⅡ的贮存库。CM 及 VLDL 形成进入血液后，需从 HDL 获得 apoCⅡ激活 LPL，CM 及 VLDL 中的甘油三酯才能水解。一旦甘油三酯完全水解后，apoCⅡ又回到 HDL。

总之，脂蛋白的代谢十分复杂，有些途径尚不十分清楚，有待进一步研究阐明，图 5-16 为脂蛋白代谢示意图。



● 图 5-16　脂蛋白代谢示意图

Ⅰ：小肠黏膜细胞摄取 TG 的消化产物，合成 TG 并生成 CM，分泌入淋巴，经胸导管入血；Ⅱ：肝细胞合成 TG 并生成 VLDL，分泌入血；Ⅲ：新生 HDL 由肝细胞和小肠黏膜细胞合成；Ⅳ：随血液流经外周组织的 CM 在 LPL、HL 等作用下，水解 TG，体积变小形成 CM 残粒，表面富含蛋白质（apoA Ⅰ等）部分脱落为新生 HDL；Ⅴ：CM 残粒通过 apoE 受体被肝细胞摄取；Ⅵ：VLDL 核心的 TG 在外周组织被 LPL、HL 等水解后体积变小，$apoB_{100}$相对含量增加，转变为 LDL，与 CM 一样，表面部分脱离形成新生 HDL；Ⅶ：LDL 被外周组织摄取、利用，并通过 apoE 受体被肝细胞摄取；Ⅷ：LDL 主要在肝细胞中分解代谢；Ⅸ：在 LCAT 的作用下，新生 HDL 先转变为 HDL_3，然后酯化胆固醇继续增加，再加上 CM 及 VLDL 水解过程中释出的磷脂、apoA Ⅰ、apoA Ⅱ等，转变为密度较小，颗粒较大的 HDL_2。此外血浆中胆固醇酯转运蛋白（CETP）能迅速将 CE 由 HDL 转移至 VLDL，后者随即转变成 LDL。HDL 中的 apoD 也是一种转脂蛋白，具有将 CE 由 HDL 表面转移到 HDL 内核的作用。血浆还存在磷脂转运蛋白（PTP）。CETP 既可促进 CE 由 HDL 向 VLDL 和 LDL 转运，又可促进 TG 由 VLDL 转移到 HDL。而 PTP 只能促进磷脂由 HDL 向 VLDL 转移。HDL 在血浆 LCAT、apoA、apoD 以及 CETP 及 PTP 的共同作用下，使 HDL 中由肝外细胞接受的 FC 不断被酯化，酯化的胆固醇约 80%转移至 VLDL 和 LDL，20%进入 HDL 内核，同时 HDL 表面的 apoE 及 apoC 转移到 VLDL，而 TG 又由 VLDL 转移至 HDL，结果使 HDL 脂双层圆盘状逐步膨胀为脂单层球状而成为成熟 HDL。HDL 分子内核的 CE 及 TG 逐渐增加，其颗粒逐步增大而其密度则逐步降低，由 HDL_3 转变为 HDL_2，再由 HDL_2 转变为 HDL_1。Ⅹ：LDL 被肝外组织细胞 $apoB_{100}$和（或）apoE 受体识别、摄取和利用，如果 LDL 被氧化，可通过包括巨噬细胞等细胞表面清道夫受体识别并被摄取；Ⅺ：成熟的 HDL 被巨噬细胞等摄取；Ⅻ：成熟的 HDL 主要在肝细胞中分解代谢

胆固醇代谢的调节

美国德克萨斯大学健康科学中心的 M. S. Brown（布朗）和 J. L. Goldstein（戈尔兹坦）教授因发现“胆固醇代谢的调控”而获得 1985 年诺贝尔生理医学奖。其主要工作为：他们发现在细胞表面存在介导富含胆固醇的 LDL 颗粒摄取的 LDL 受体。家族性高胆固醇血症患者 LDL 受体功能部分或完全缺乏。正常人饮食胆固醇的摄入可抑制细胞胆固醇的合成。当某种因素使得细胞表面 LDL 受体减少时，血液中胆固醇含量增加，继而聚集在动脉壁引起动脉粥样硬化，并导致心脏病发作和中风的发生。他们的研究成果为动脉粥样硬化的治疗、预防等提供新的思路。

四、血浆脂蛋白代谢异常导致血脂异常或高脂血症

（一）高脂蛋白血症

血脂水平高于正常范围上限即为高脂血症（hyperlipidemia）。目前在临床实践中，高脂血症指血浆胆固醇或甘油三酯的升高超过正常范围的上限，称为高胆固醇血症或高甘油三酯血症。由于血脂在血中以脂蛋白形式存在和运输，高脂血症也表现为不同类型的脂蛋白的升高。因此，高脂血症也可以认为是高脂蛋白血症（hyperlipoproteinemia）。正常人上限标准因地区、膳食、年龄、劳动状况、职业以及测定方法不同而有差异。一般以成人空腹12～14小时血甘油三酯超过2.26mmol/L（200mg/dl），胆固醇超过6.21mmol/L（240mg/dl），儿童胆固醇超过4.14mmol/L（160mg/dl）为高脂血症标准。

1970年世界卫生组织（WHO）建议将高脂蛋白血症分为六型，其血浆脂蛋白及血脂的改变见表5-9。

表5-9　高脂蛋白血症分型

分型	血浆脂蛋白变化	血脂变化	
Ⅰ	CM增高	胆固醇↑	甘油三酯↑↑↑
Ⅱa	LDL增加	胆固醇↑↑	
Ⅱb	VLDL和LDL同时增加	胆固醇↑↑	甘油三酯↑↑
Ⅲ	IDL增加（电泳时出现宽带）	胆固醇↑↑	甘油三酯↑↑
Ⅳ	LDL增加		甘油三酯↑↑
Ⅴ	VLDL和CM同时增加	胆固醇↑	甘油三酯↑↑↑

高脂血症可分为原发性和继发性两大类。继发性高脂血症是继发于其他疾病如糖尿病、肾病和甲状腺功能减退等。原发性高脂血症是原因不明的高脂血症，已证明有些是遗传性缺陷。

（二）动脉粥样硬化

动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）指一类动脉壁的退行性病理变化。以AS为病理基础的疾病如冠状动脉粥样硬化性心脏病等心血管疾病严重威胁着人们的健康和生命。其确切病因至今尚未完全明了，且发病机制十分复杂。研究表明，血浆脂蛋白质与量的变化与AS的发生发展密切相关。其中LDL、VLDL具有致AS作用，而HDL具有抗AS作用。

1. LDL和VLDL具有致AS作用　AS的病理基础之一是大量脂质沉积于动脉内皮下基质，被平滑肌、巨噬细胞等吞噬形成泡沫细胞。研究表明，血浆LDL量与质的变化均可导致AS的发生。已知血浆LDL水平升高往往与AS的发病率呈正相关。当血液中LDL水平升高时，LDL堆积于动脉分支或弯曲等AS病变多发处，并通过某种因素引起增大的内皮细胞间隙被动地扩散入并聚集于血管内膜下，与其他脂蛋白如VLDL残粒、Lp（a）等共同作用，导致AS的发生。

研究表明，LDL在血管壁经氧化先形成极轻度修饰的LDL（minimally modified LDL，mmLDL），进一步氧化形成oxLDL。oxLDL不能被LDL受体识别，但能被巨噬细胞和平滑肌细胞膜上的清道夫受体如SR-A和CD36等所识别结合而吞噬。oxLDL能直接吸引循环中的单核细胞进入动脉壁。进入动脉壁的单核细胞在巨噬细胞集落刺激因子等诱

导分化为巨噬细胞，巨噬细胞通过清道夫受体迅速摄取 oxLDL，而清道夫受体不受细胞内胆固醇的下调作用，打破了巨噬细胞内胆固醇摄入与流出的动态平衡，导致巨噬细胞内胆固醇和 CE 大量聚集而形成泡沫细胞，促进 AS 的发生。

血浆 LDL 来自 VLDL 的降解，故 VLDL 水平升高可间接引起 LDL 的升高。此外，VLDL 可引起巨噬细胞内甘油三酯的堆积，因而对 AS 的发生有促进作用。VLDL 残粒代谢受阻时，可被巨噬细胞吞噬，从而促进泡沫细胞的形成。

2. HDL 具有抗 AS 作用　流行病学调查表明，血浆 HDL 浓度与 AS 的发生呈负相关。其抗 AS 形成的机制主要为：HDL 可将肝外组织，包括将动脉壁、巨噬细胞等组织细胞的胆固醇转运至肝，降低了动脉壁胆固醇含量，同时还具有抑制 LDL 氧化的作用等。在含氧的血液环境中，被氧化的 HDL（oxidized HDL，oxHDL）失去抑制 LDL 氧化的能力，且 RCT 能力降低等，导致其抗 AS 的作用明显降低。

除脂蛋白质与量的变化外，从脂蛋白代谢的角度审视 AS 的发生发展机制，还与脂蛋白代谢的关键酶、受体等异常有关。

（三）遗传性缺陷

已发现参与脂蛋白代谢的关键酶如 LPL 及 LCAT，载脂蛋白如 apoCⅡ、apoB、apoE、apoAⅠ和 apoCⅢ，以及脂蛋白受体如 LDL 受体等的遗传性缺陷，都能引起血浆脂蛋白代谢的异常，并导致高脂蛋白血症的产生。已证实 LPL 缺陷可导致Ⅰ型或Ⅴ型高脂蛋白血症；apoCⅡ基因缺陷而不能激活 LPL，可产生与 LPL 缺陷相似的异常脂蛋白血症；LCAL 缺乏导致 CE 水平下降；apoB 基因缺陷可导致血浆 VLDL、LDL 及 CM 降低；LDL 受体缺陷可引起家族性高胆固醇血症等。其中 Brown 及 Goldstein 对 LDL 受体的研究取得重大突破，他们不仅阐明了 LDL 受体的结构和功能，而且证明 LDL 受体缺陷是引起家族性高胆固醇血症的重要原因。LDL 受体缺陷是常染色体显性遗传，纯合子细胞膜 LDL 受体完全缺乏，杂合子 LDL 受体数目减少一半，LDL 不能正常代谢，血浆胆固醇分别高达 15.6～20.8mmol/L（600～800mg/dl）及 7.8～10.4mmol/L（300～400mg/dl），患者在 20 岁前就发生典型的冠心病症状。

小　　结

脂类分为脂肪（甘油三酯）及类脂两大类。脂肪是人体的重要营养素，主要功能是储能及供能。类脂包括胆固醇及其酯、磷脂及糖脂等，是生物膜的重要组分，参与细胞识别及信息传递，是多种生理活性物质的前体。

脂类消化主要在小肠上段，经各种脂或酯酶及胆汁酸盐的共同作用，脂类被水解为甘油、脂酸及一些不完全水解产物，主要在空肠被吸收。吸收的甘油及中、短链脂酸，经门静脉进入血循环；长链脂酸（12～26C）在小肠黏膜上皮细胞内再合成为脂肪，与 $apoB_{48}$、磷脂、胆固醇等形成 CM 后经淋巴进入血循环。

甘油三酯是机体能量储存的主要形式。肝、脂肪组织及小肠是合成甘油三酯的主要场所，以肝合成能力最强。合成所需的甘油及脂酸主要由葡萄糖代谢提供。机体可利用 3-磷酸甘油与活化的脂酸酯化生成磷脂酸，然后经脱磷酸及再酯化即可合成甘油三酯。

甘油三酯水解产生甘油和脂酸。甘油活化、脱氢、转变为磷酸二羟丙酮后，循糖代谢途径代谢。脂酸则在肝、肌、心等组织中分解氧化、释出大量能量，以 ATP 形式供机体利用。脂酸的分解需经活化，进入线粒体，β-氧化（脱氢、加水、再脱氢及硫解）等步骤。脂酸在肝内 β 氧化生成酮体，但肝不能利用酮体，需运至肝外组织氧化。长期饥饿时脑及肌组织主要靠酮体氧化供能。

脂酸合成是在胞液中脂酸合成酶系的催化下，以乙酰 CoA 为原料，在 NADPH、ATP、HCO_3^- 及 Mn^{2+} 的参与下，逐步缩合而成的。乙酰 CoA 需先羧化成丙二酰 CoA 后才参与还原性合成反应，所需之氢全部由 NADPH 提供，最终合成 16 碳软脂酸。更长链的脂酸则是对软脂酸的加工，使其碳链延长。碳链延长在肝细胞内质网或线粒体中进行。脂酸脱氢可生成不饱和脂酸，但亚油酸（18∶2，$\Delta^{9,12}$）、亚麻酸（18∶3，$\Delta^{9,12,15}$）等多不饱和脂酸人体不能合成，必须从食物摄取。花生四烯酸（20∶4，$\Delta^{5,8,11,14}$）等是前列腺素、白三烯等生理活性物质的前体。

磷脂分为甘油磷脂和鞘磷脂两大类，甘油磷脂的合成是以磷脂酸为前体，需 CTP 参与。甘油磷脂的降解是磷脂酶 A、B、C、D 催化下的水解反应。鞘磷脂是以软脂酸及丝氨酸为原料先合成二氢鞘氨醇后，再与脂酰 CoA 和磷酸胆碱合成鞘磷脂。

人体胆固醇的来源一是自身合成，二是从食物摄取。摄入过多可抑制胆固醇的吸收及体内胆固醇的合成。胆固醇的合成以乙酰 CoA 为原料，先缩合成 HMG CoA，然后还原脱羧形成甲羟戊酸再磷酸化，进一步缩合成鲨烯，后者环化即转变为胆固醇。合成 1 分子胆固醇需 18 分子乙酰 CoA，16 分子 NADPH 及 36 分子 ATP。胆固醇在体内可转化为胆汁酸、类固醇激素、维生素 D_3 及胆固醇酯。

血脂不溶于水，以脂蛋白形式运输。按超速离心法及电泳法可将血浆脂蛋白分为乳糜微粒（CM）、极低密度脂蛋白（前 β-）、低密度脂蛋白（β-）及高密度脂蛋白（α-）四类。CM 主要转运外源性甘油三酯及胆固醇，VLDL 主要转运内源性甘油三酯，LDL 主要将肝合成的内源性胆固醇转运至肝外组织，而 HDL 则参与胆固醇的逆向转运。

血脂水平高于正常范围上限即为高脂血症，也可以认为是高脂蛋白血症。高脂血症可分为原发性和继发性两大类。继发性高脂血症是继发于其他疾病如糖尿病、肾病和甲状腺功能减退等。原发性高脂血症是原因不明的高脂血症，已证明有些是遗传性缺陷。研究表明，血浆脂蛋白质与量的变化与 AS 的发生发展密切相关。其中，LDL、VLDL 具有致动脉粥样硬化（AS）作用，而 HDL 具有抗 AS 作用。

（汪　渊）

第六章 生物氧化

糖、脂肪、蛋白质等营养物在体内经分解代谢，最终生成二氧化碳和水，同时逐步释放能量，供生命活动所需。其中有相当一部分能量需要驱动 ADP 磷酸化生成 ATP，因为 ATP 才是能被细胞直接利用的主要能量形式，是机体能量生成、利用过程的核心。其余能量主要以热能形式释放，可用于维持体温。这是营养物质在生物体内进行的氧化，即生物氧化(biological oxidation)的主要功能。

生物氧化遵循氧化还原反应的一般规律，如物质的氧化方式有加氧、脱氢、失电子，物质在体内外氧化时最终产物(CO_2、H_2O)和释放能量都相同。但生物氧化又具有与体外氧化(燃烧)明显不同的特点：如在条件温和(体温，pH 接近中性)的细胞内进行，反应在一系列酶催化下逐步进行，物质氧化的能量得以逐步释放，有利于机体捕获能量，增加 ATP 生成的效率。生物氧化过程常见的加水脱氢反应使物质能间接获得氧，并增加脱氢及产生更多还原当量($NADH+H^+$，$FADH_2$)的机会；生物氧化中生成的水是由脱下的氢与氧结合产生的，CO_2 由有机酸脱羧产生。

第一节 生成 ATP 的氧化磷酸化体系

一、氧化呼吸链是一系列有电子传递功能的氧化还原组分

真核细胞 ATP 生成主要发生在线粒体中。营养物质代谢脱下的成对氢原子以还原当量形式存在（$NADH+H^+$，$FADH_2$），再通过多种酶和辅酶催化的氧化还原连锁反应逐步传递，最终与氧结合生成水。逐步释放的能量可驱动 ATP 生成。由于该过程与细胞呼吸有关，这一包含多种氧化还原组分的传递链称为氧化呼吸链（oxidative respiratory chain）。在氧化呼吸链中，参与氧化还原作用的酶和辅酶按一定顺序排列在线粒体内膜上。其中传递氢的酶或辅酶称之为递氢体，传递电子的酶或辅酶称之为电子传递体。而递氢也需传递电子（$2H \rightleftharpoons 2H^+ + 2e$），它们都起传递电子的作用，所以氧化呼吸链又称电子传递链（electron transfer chain）。

（一）氧化呼吸链由 4 种具有传递电子能力的复合体组成

线粒体内膜蛋白质用胆酸等去污剂处理及离子交换层析分离，可纯化出内膜的呼吸链成分，得到 4 种仍具有传递电子功能的蛋白质-酶复合体（complex），各含有不同的组分（表 6-1）。其中复合体Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ完全镶嵌在线粒体内膜中，复合体Ⅱ镶嵌在内膜的内侧（图 6-1）。酶复合体是线粒体内膜氧化呼吸链的天然存在形式，而其所含各组分将具体完成电子传递过程。电子传递氧化过程释放的能量驱动 H^+ 移出线粒体内膜，转变为跨内膜 H^+ 梯度的能量，再用于 ATP 的生物合成。下面将分别叙述氧化呼吸链中各酶复合体中主要酶或辅酶组分的氧化还原作用及相应电子传递的过程。

1. 复合体Ⅰ作用是将 $NADH+H^+$ 中的电子传递给 复合体Ⅰ又称 NADH-泛醌还原酶，在三羧酸循环和脂酸 β-氧化等过程的脱氢酶催化反应中，大部分代谢物脱下的 2H 是由氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide，NAD^+）接受，形成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（$NADH+H^+$）。$NADH+H^+$ 的电子经复合体Ⅰ继续传递氧化。复合体Ⅰ由三部分组成，呈“L”型。一臂突出线粒体基质，包括两部分：黄素蛋白（flavoprotein）含黄素单核苷酸（flavin mononucleotide，FMN）辅基及 2 个铁硫中

心（iron-sulfur center，Fe-S），而铁硫蛋白（iron-sulfur protein）含 3 个铁硫中心辅基。嵌于内膜的横臂为疏水蛋白部分，也含 1 个 Fe-S。复合体Ⅰ由基质接受还原型 NADH 中的 2H 和 2 电子传递给 FMN，FMN 再经一系列铁硫中心，将电子传递到泛醌（ubiquinone），泛醌又称辅酶 Q（coenzyme Q，CoQ，Q）。泛醌将电子通过疏水蛋白中 Fe-S 再传递给内膜的泛醌。每次传递电子过程同时可偶联将 4 个 H^+ 从内膜基质侧（显负电，N 侧）泵到内膜胞质侧（显正电，P 侧），复合体Ⅰ有质子泵功能。

表 6-1 人线粒体呼吸链复合体

复合体	酶名称	质量（kD）	多肽链数	功能辅基	含结合位点
复合体Ⅰ	NADH-泛醌还原酶	850	39	FMN，Fe-S	NADH（基质侧） CoQ（脂质核心）
复合体Ⅱ	琥珀酸-泛醌还原酶	140	4	FAD，Fe-S	琥珀酸（基质侧） CoQ（脂质核心）
复合体Ⅲ	泛醌-细胞色素 c 还原酶	250	11	血红素 b_L，b_H，c_1，Fe-S	Cyt c（膜间隙侧）
细胞色素 c		13	1	血红素 c	Cyt c_1，Cyt a
复合体Ⅳ	细胞色素 c 氧化酶	162	13	血红素 a，血红素 a_3，Cu_A，Cu_B	Cyt c（膜间隙侧）

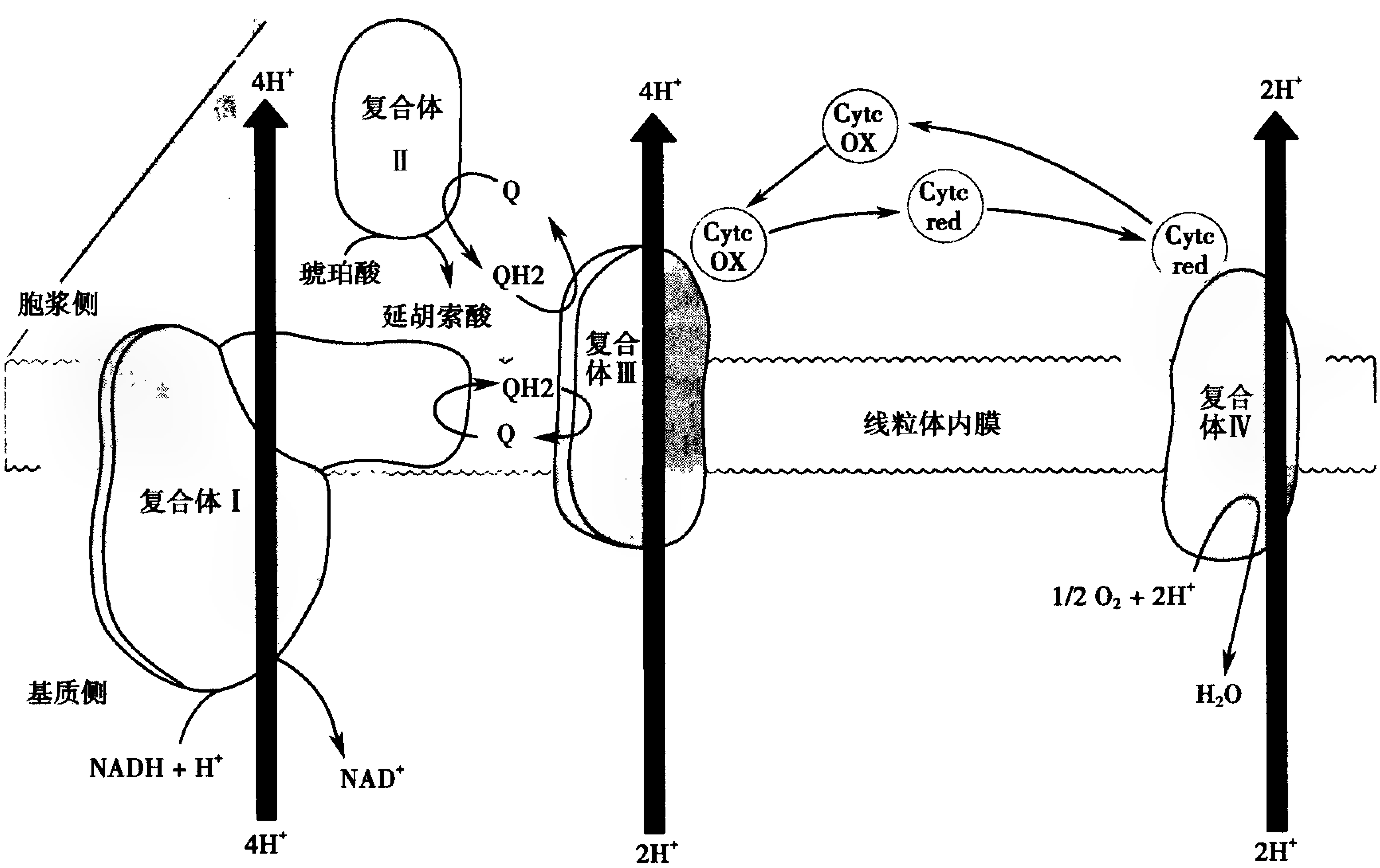
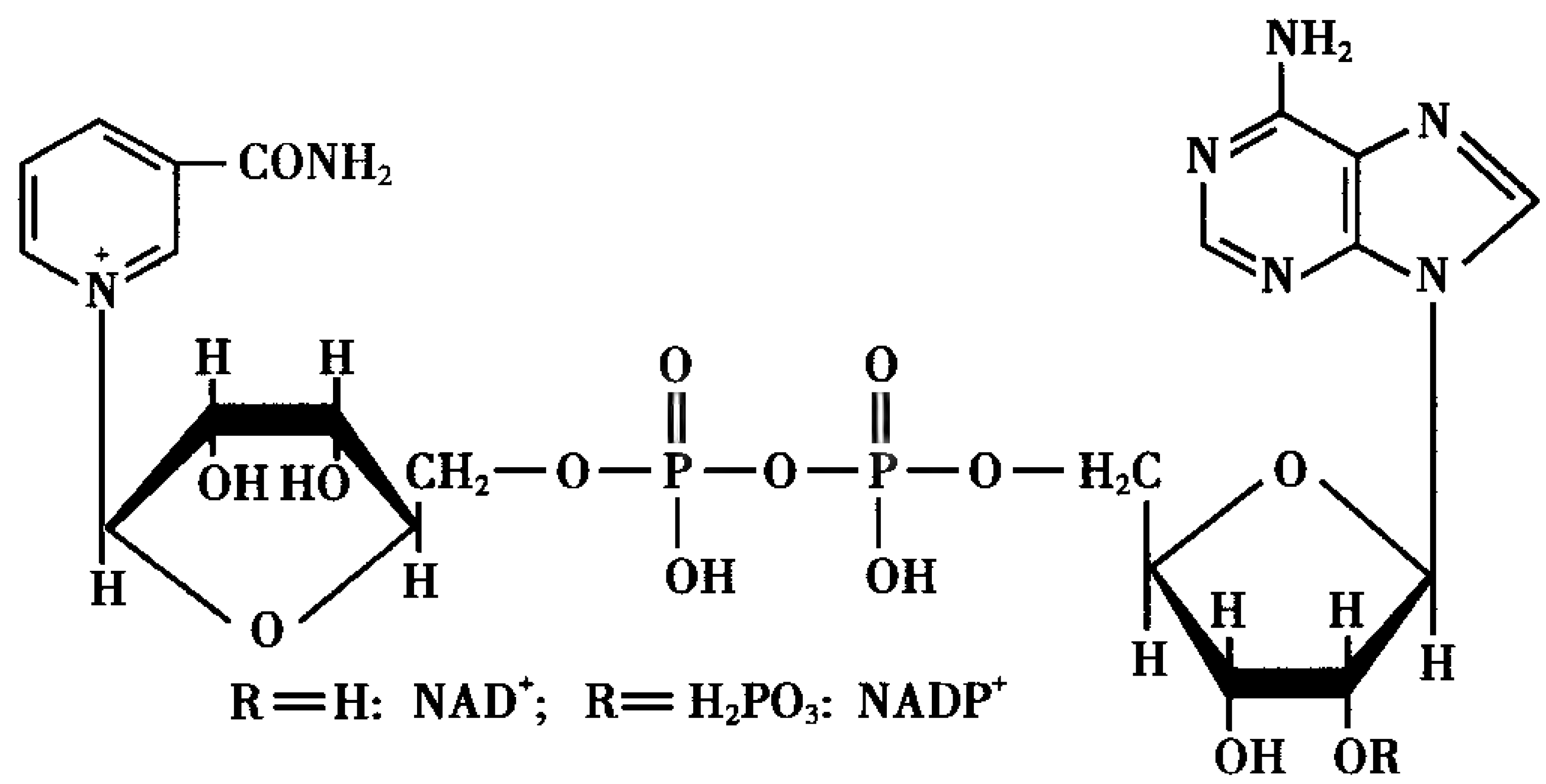


图 6-1 电子传递链各复合体位置示意图
泛醌和细胞色素 c 是可移动的电子载体

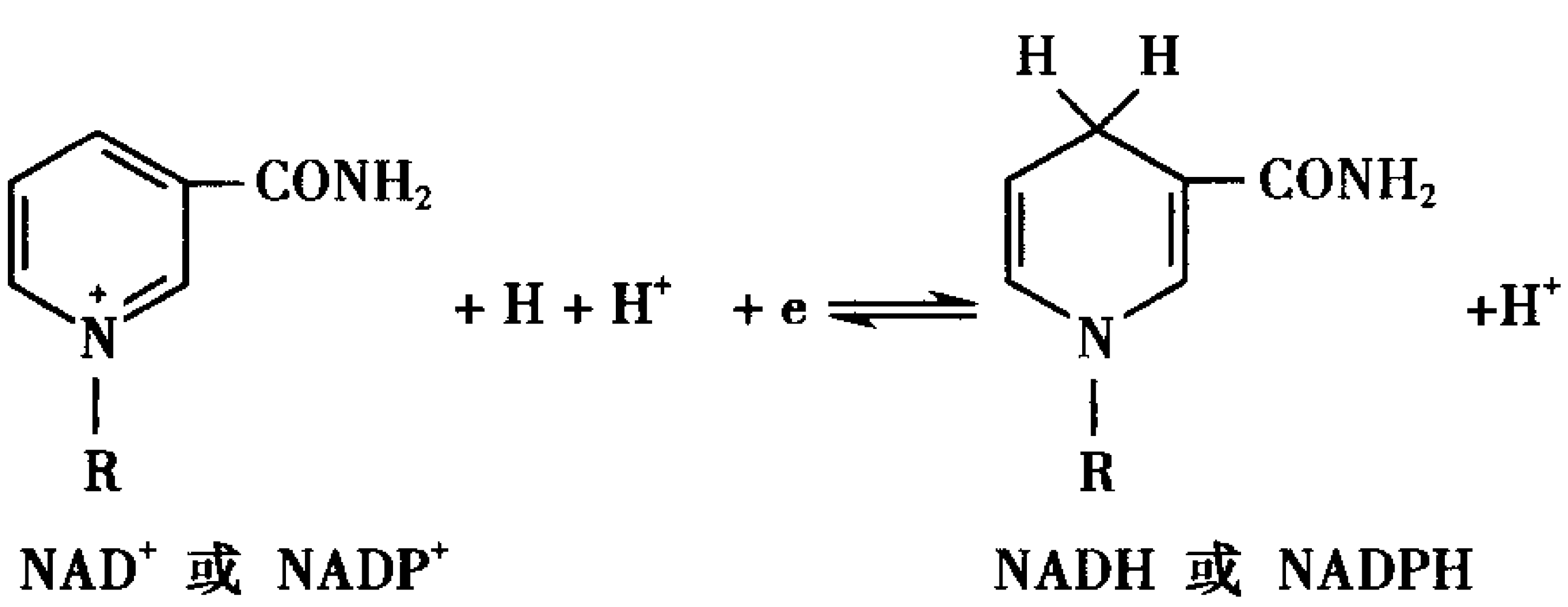
NAD^+（辅酶Ⅰ，coenzyme Ⅰ，CoⅠ）是烟酰胺脱氢酶类的辅酶，其结构式如下（图 6-2）：

NAD^+ 分子中功能部分烟酰胺的氮为五价，还原时能接受电子成为三价氮，且其对侧



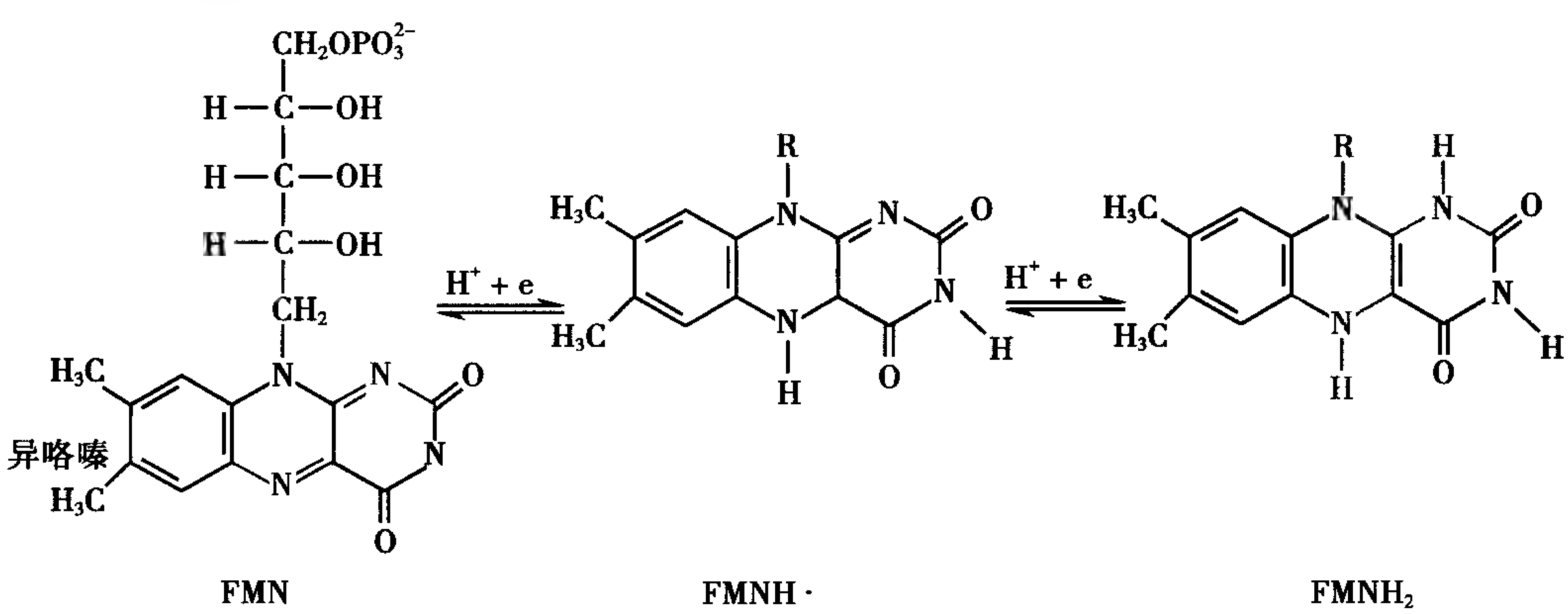
● 图 6-2　NAD$^+$的结构式

的碳原子可进行加氢反应，氧化时反应逆行，有可逆的氧化还原作用，为双电子传递体。烟酰胺在加氢反应时只能接受 1 个氢原子和 1 个电子，将另一个 H^+游离出来，因此将还原型的 NAD^+写成 $NADH+H^+$（NADH）（图 6-3）。



● 图 6-3　NAD$^+$的加氢和脱氢反应

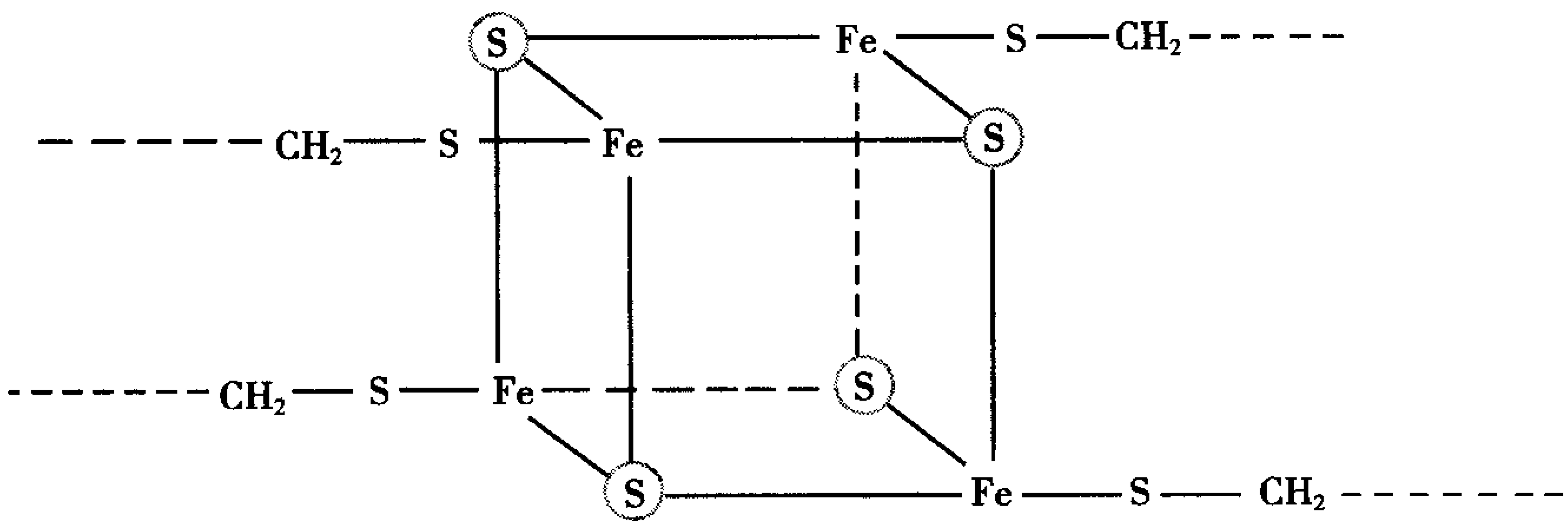
FMN 及 FAD 中含有核黄素（维生素 B_2），其发挥功能的结构是异咯嗪环，在可逆的氧化还原反应中显示 3 种分子状态，属于单、双电子传递体。氧化型 FMN 可接受 1 个质子和 1 个电子形成不稳定的 FMNH·，再接受 1 个质子和 1 个电子转变为还原型 FMN（$FMNH_2$），氧化时反应逐步逆行（图 6-4）。因此可在双、单电子传递体间进行电子传递。



● 图 6-4　FMN 的加氢和脱氢反应

氧化呼吸链有多种铁硫蛋白，其 Fe-S 辅基含有等量的铁原子和硫原子（如 Fe_2S_2，Fe_4S_4），通过其中的铁原子与无机硫或铁硫蛋白中蛋白部分的半胱氨酸残基的硫相连接（图 6-5）。其中的一个铁原子可进行 $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e$ 的可逆反应，每次传递一个电子，因此铁硫蛋白为单电子传递体。在复合体Ⅰ中含有 7 个铁硫中心共 20～26 个铁原子，其功能是将 $FMNH_2$ 的电子传递给泛醌。

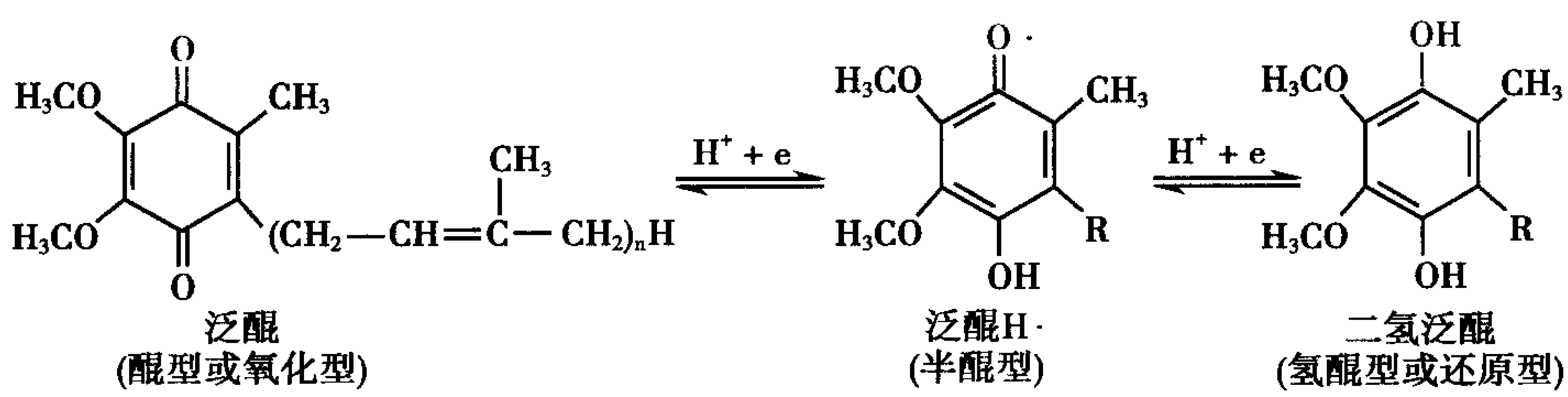
泛醌是一种小分子、脂溶性醌类化合物。它有多个异戊二烯（2-甲基丁烯）单位互相连接形成较长的侧链。因侧链的强疏水作用，它能在线粒体内膜中自由扩散，不包含在上述复合体中。人的 CoQ 侧链由 10 个异戊二烯单位组成，用 CoQ10（Q10）表示。泛醌和



● 图 6-5 线粒体中铁硫中心 Fe_4S_4 的结构

S 表示无机硫

FMN 类似，能进行可逆的氧化还原反应传递电子。泛醌分子有 3 种氧化还原状态，接受 1 个电子和 1 个质子还原成半醌型泛醌，再接受 1 个电子和 1 个质子还原成二氢泛醌，后者可逆向反应再被逐步氧化为泛醌（图 6-6）。泛醌作为内膜中可移动电子载体，重要功能是在各复合体间募集并穿梭传递还原当量和电子。由于泛醌可以同时传递氢和电子，还在下述的电子传递和质子移动的偶联中起着核心作用。



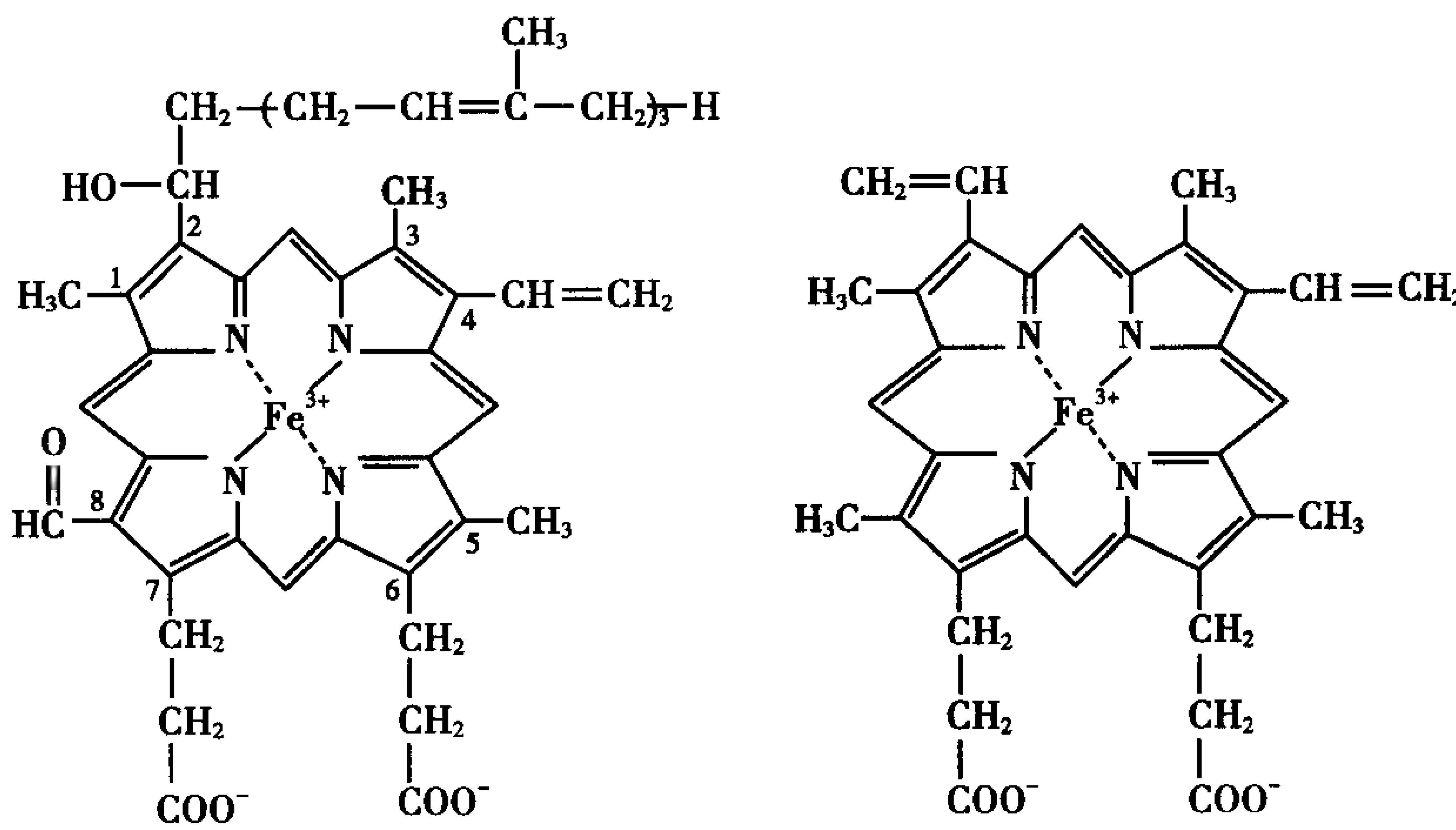
● 图 6-6 泛醌的加氢和脱氢反应

2. 复合体Ⅱ作用是将电子从琥珀酸传递到泛醌 复合体Ⅱ是三羧酸循环中的琥珀酸脱氢酶，又称琥珀酸-泛醌还原酶，其功能是将电子从琥珀酸传递给泛醌。人复合体Ⅱ又称黄素蛋白 2（FP_2），含黄素腺嘌呤二核苷酸（flavin adenine dinucleotide，FAD）辅基。人复合体Ⅱ由 4 个亚基组成，2 个铁硫蛋白，含 3 个铁硫中心（Fe_4S_4、Fe_4S_3 和 Fe_2S_2），此外还有 2 个小疏水亚基，将复合体锚定于内膜。琥珀酸脱氢生成还原型 $FADH_2$，电子的传递次序是：$FADH_2$ 传递电子到铁硫中心，然后传递给泛醌。该过程传递电子释放的自由能较小，不足以将 H^+ 泵出内膜，因此复合体Ⅱ没有 H^+ 泵的功能。代谢途径中另外一些含 FAD 的脱氢酶，如脂酰 CoA 脱氢酶、α-磷酸甘油脱氢酶、胆碱脱氢酶，可以不同方式将相应底物脱下的 2 个 H^+ 和 2 个电子经 FAD 传递给泛醌，进入氧化呼吸链。

3. 复合体Ⅲ作用是将电子从还原型泛醌传递给细胞色素 c 泛醌从复合体Ⅰ、Ⅱ募集还原当量和电子并穿梭传递到复合体Ⅲ。人复合体Ⅲ又称细胞色素 b-c_1 复合体，含有细胞色素 b（b_{562}，b_{566}）、细胞色素 c_1 和一种可移动的铁硫蛋白（rieske protein）。复合体Ⅲ电子传递过程是电子从泛醌经铁硫蛋白传递给细胞色素 c，因此又称泛醌-细胞色素 c 还原酶。

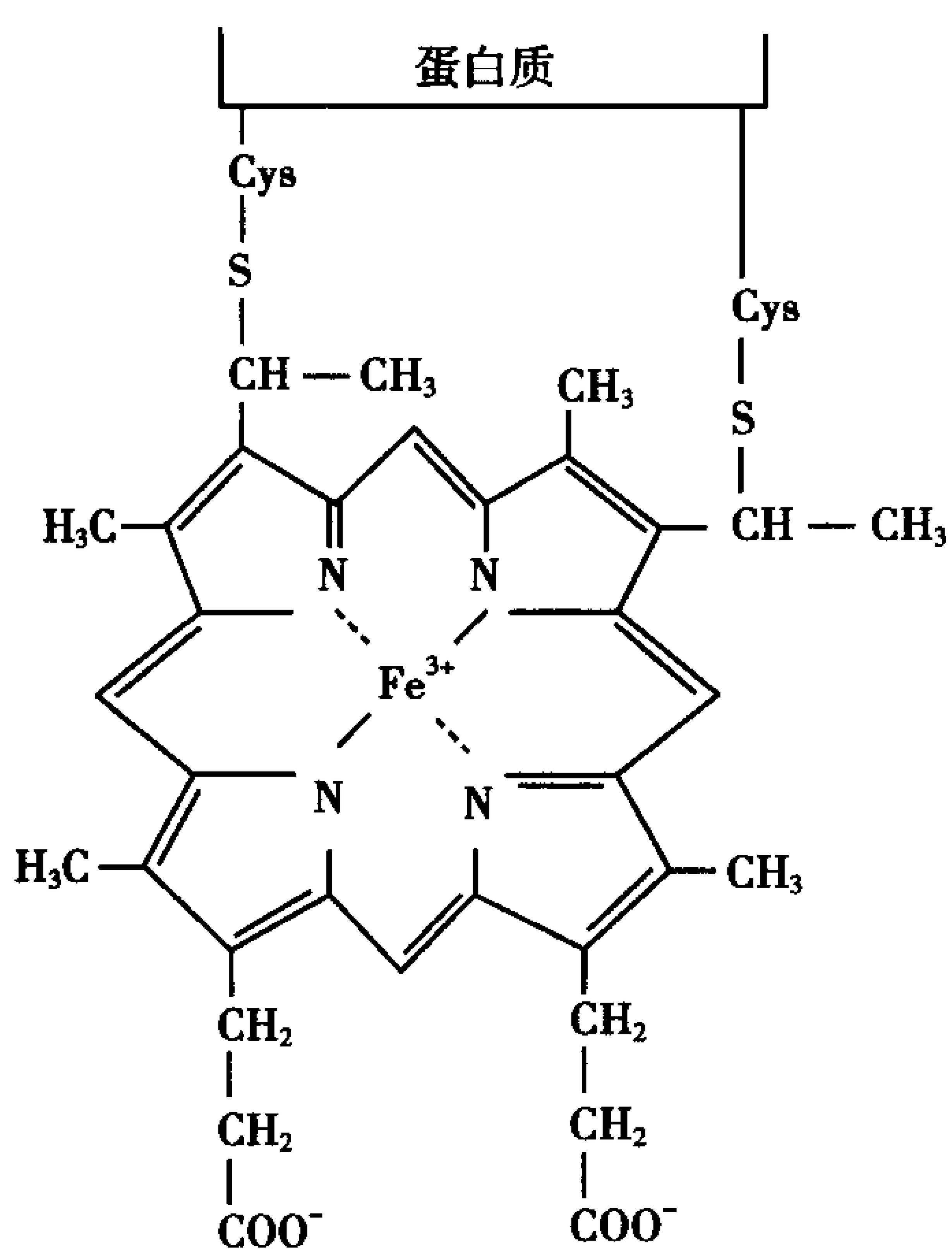
细胞色素（cytochrome，Cyt）是一类含血红素样辅基的电子传递蛋白，血红素中的铁原子可进行 $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e$ 反应传递电子，为单电子传递体。还原型细胞色素均有特征的 α、β、γ 三个可见吸收峰。而氧化型细胞色素吸收峰和还原型比较有明显改变，可作为分析细胞色素种类和状态的重要指标。根据它们吸收光谱和最大吸收波长不同，可将线粒体的细胞色素分为细胞色素 a、b、c（Cyt a，Cyt b，Cyt c）三类，及不同亚类。各种细胞

色素光吸收性质不同是由于辅基铁卟啉环的侧链以及血红素所处分子环境各有不同。细胞色素 b 的铁卟啉是铁-原卟啉Ⅸ，与血红蛋白的血红素相同，称为血红素 b（图 6-7）。细胞色素 c 中，铁-原卟啉Ⅸ的乙烯侧链与蛋白质部分的半胱氨酸残基的巯基相连接，称血红素 c（图 6-8）。而 Cyt a 中与原卟啉Ⅸ环相连的 1 个甲基被甲酰基取代，1 个乙烯基侧链连接一条聚异戊二烯长链，称血红素 a（图 6-7）。



● 图 6-7　细胞色素的血红素 a 辅基（左）和血红素 b 辅基（右）结构

人复合体Ⅲ为二聚体，呈梨形。每单体中有 11 个多肽。其铁硫蛋白和 Cyt c_1 结构近似，都有球形结构域，并以疏水区段锚定内膜。Cyt b 亚基结合 2 个不同血红素辅基，一个还原电位较低称 Cyt b_L，根据吸收波长称 Cyt b_{566}，另一个电位较高称 Cyt b_H，根据吸收波长称 Cyt b_{562}，更近内膜基质侧。复合体Ⅲ还有 2 个泛醌结合位点，分处内膜胞质侧和基质侧，称为 Q_P 和 Q_N 位点。



● 图 6-8　细胞色素的血红素 c 辅基结构

复合体Ⅲ的电子传递过程通过“Q 循环”（Q cycle）实现。“Q 循环”是一个复杂的电子传递过程，最终电子从泛醌经铁硫蛋白传递给 Cyt c_1。每 2 分子 QH_2 通过 Q 循环，生成 1 分子 QH_2，将 2 个电子传给 Cyt c_1，并向膜间隙释放 $4H^+$。

Cyt c 是氧化呼吸链唯一水溶性球状蛋白，与线粒体内膜外表面疏松结合，不包含在上述复合体中。Cyt c 可将从 Cyt c_1 获得的电子传递到复合体Ⅳ。

4. 复合体Ⅳ将电子从细胞色素 c 传递给氧　人复合体Ⅳ又称细胞色素 c 氧化酶（cytochrome c oxidase），包含 13 个亚基，其中亚基Ⅰ～Ⅲ由线粒体基因编码，含所有必需的 Fe、Cu 离子位点，其他 10 亚基起调节作用。亚基Ⅱ、Ⅲ分别位于亚基Ⅰ两侧，亚基Ⅱ内膜胞质侧膜外域含桶状的 10 股 β 结构，稳定结合一 Cu 离子，称 Cu_A。亚基Ⅰ呈圆柱形，含 2 个与内膜垂直的血红素辅基，还原电位不同，分别称为 Cyt a 和 Cyt a_3，由 α-螺旋结构支持。另一个 Cu 离子，称 Cu_B。复合体Ⅳ中含 4 个氧化还原中心，即 2 个血红素中心（Cyt a，Cyt a_3），2 个 Cu 位点（Cu_A，Cu_B），组成 Cyt a-Cu_A 和 Cyt a_3-Cu_B 两组传递电子功能单元。这种蛋白结合 Cu 可发生 $Cu^+ \rightleftharpoons Cu^{2+} + e$ 的可逆反应，也属单电子传递

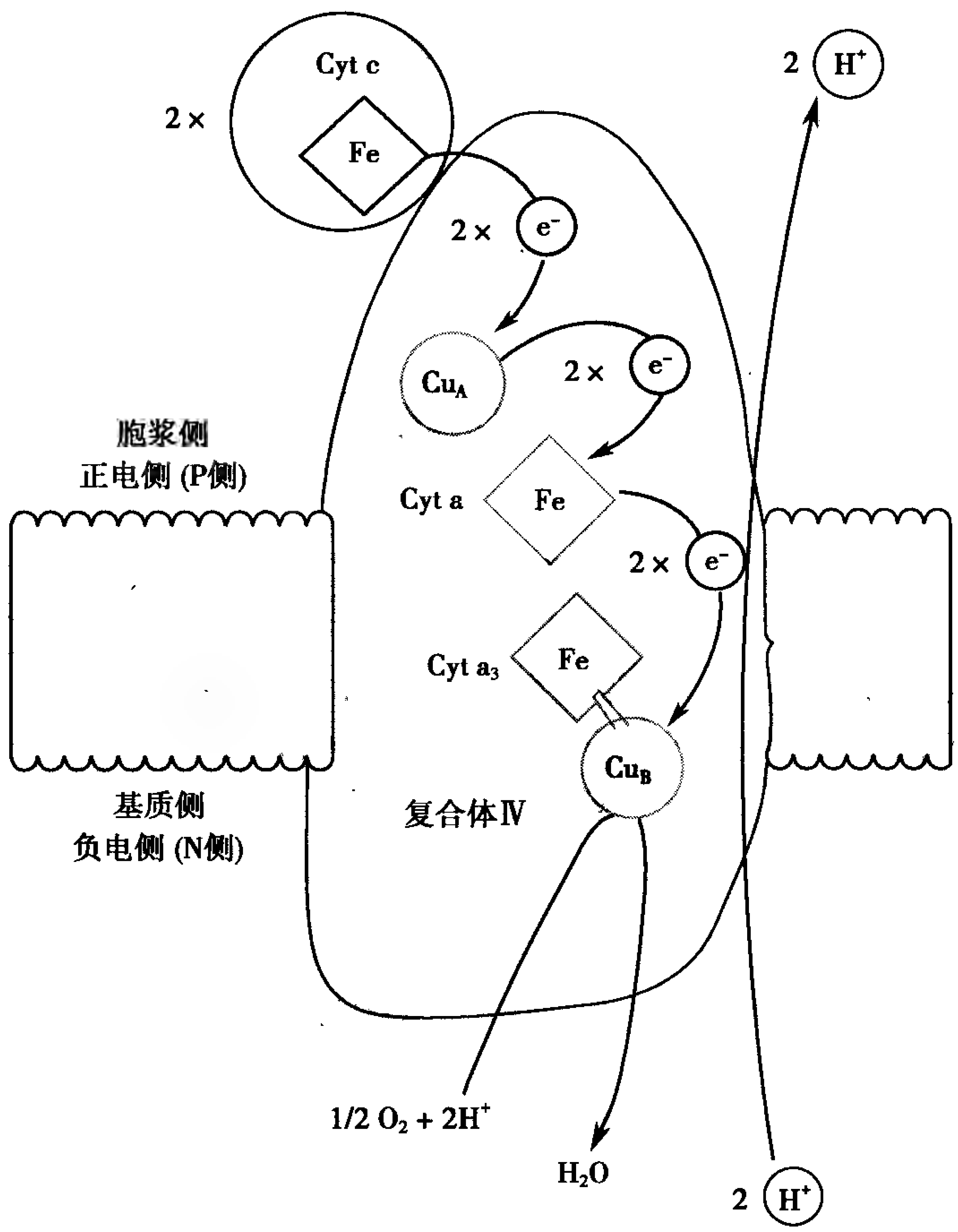
体。电子由 Cu_A 传递到 Cyt a，Cu_A 和 Cyt a 的 Fe 间密切接触，仅距 1.5nm。而 Cu_B 和 Cyt a_3 的 Fe 定位接近，且共结合同一配体（可能为 Cys 的 S），形成称为双核中心（binuclear center）的功能单元。

复合体Ⅳ电子传递过程是，Cyt c 供出的电子经 Cu_A 传递到 Cyt a，再到 Cu_B-Cyt a_3 双核中心。需要依次传递 4 个电子，并从线粒体基质获得 4 个 H^+，最终将 1 个 O_2 分子还原成 2 分子 H_2O，该过程在双核中心上进行（图 6-9）。Cyt a 传递电子到氧化态双核中心（Cu^{2+} 和 Fe^{3+}），经 Cu_B 到 Cyt a_3，第二个电子使 Cyt a_3 还原为 Fe^{2+} 并使双核中心结合 O_2 分子，形成过氧桥连接的 Cu_B 和 Cyt a_3，相当于 2 个电子传递给结合的 O_2。中心再获得 2 个 H^+ 和第三个电子，O_2 分子键断开，Cyt a_3 出现 Fe^{4+} 中间态。再接受第四个电子，形成 Cu_B 和 Cyt a_3 的 Fe 各结合—OH 基团中间态。最后再获得 2 个 H^+，双核中心解离出 2 个 H_2O 分子后恢复初始氧化状态（图 6-10）。生成的 H_2O 通过亚基Ⅰ、Ⅲ间亲水通道排入胞质侧。复合体Ⅳ也有质子泵功能，相当每 2 个电子传递过程使 2 个 H^+ 跨内膜向胞质侧转移。

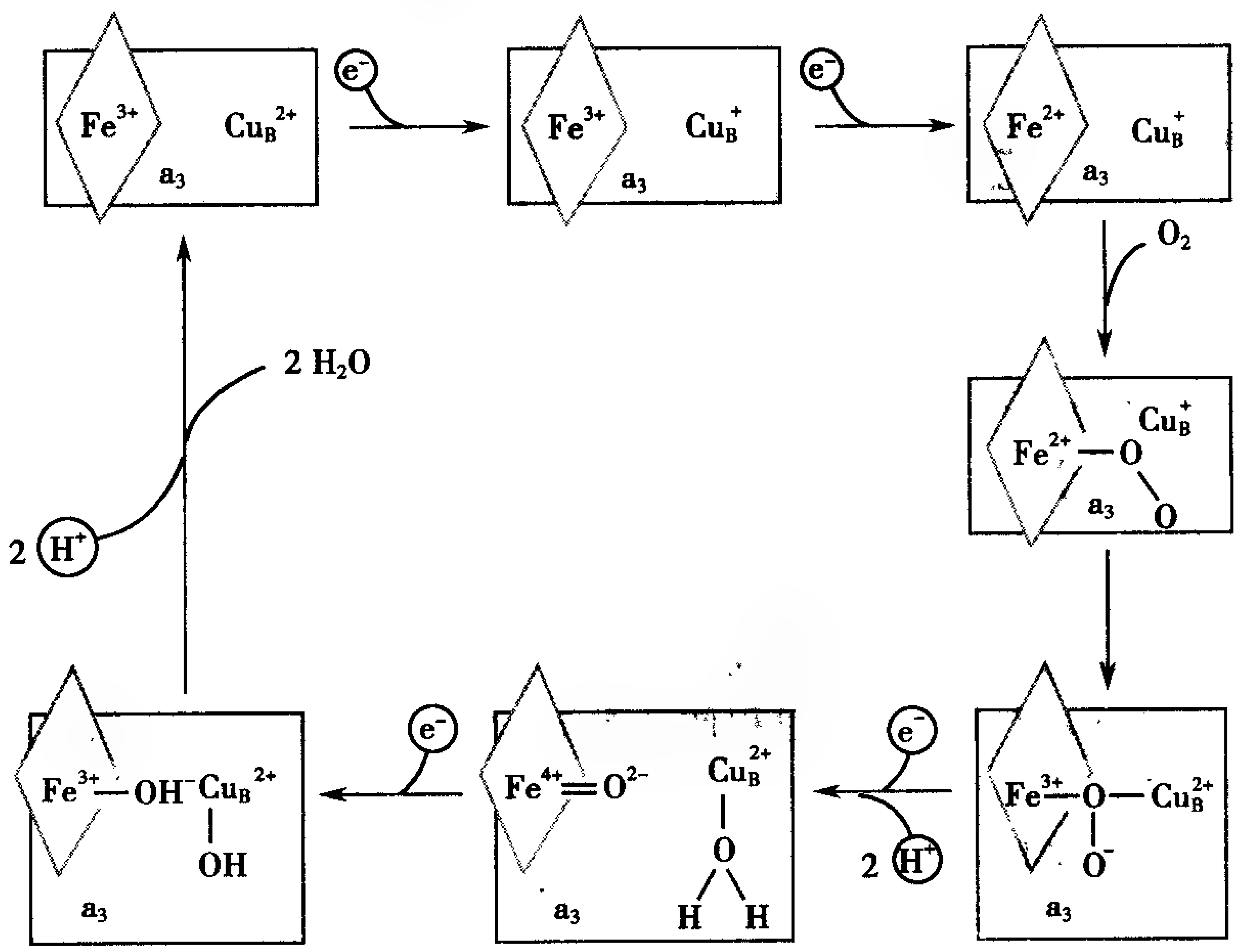
由于上述 O_2 获得电子过程产生的有强氧化性 O_2^- 和 O_2^{2-} 离子中间物始终和双核中心紧密结合，不会引起对细胞组分的损伤。

（二）氧化呼吸链组分按氧化还原电位由低到高的顺序排列

呼吸链组分的排列顺序是由下列实验确定的：①根据呼吸链各组分的标准氧化还原电位，由低到高的顺序排列。电子应从电位低组分向电位高组分传递（表 6-2）。②底物存在时，利用呼吸链特异的抑制剂阻断某一组分的电子传递，在阻断部位以前的组分处于还原



● 图 6-9 复合体Ⅳ的电子传递过程



● 图 6-10　细胞色素 c 氧化酶 Cu_B-Cyt a_3 中心使 O_2 还原成水的过程

状态，后面组分处于氧化状态。可利用呼吸链各组分的氧化和还原状态吸收光谱差别，根据吸收光谱的改变分析排列次序。③利用呼吸链各组分特有的吸收光谱，以离体线粒体无氧时处于还原状态作为对照，缓慢给氧，观察各组分被氧化的顺序。④在体外将呼吸链拆开和重组，鉴定四种复合体的组成与排列。

表 6-2　呼吸链中各种氧化还原对的标准氧化还原电位

氧化还原对	$E^{\ominus}$（V）	氧化还原对	$E^{\ominus}$（V）
NAD^+/NADN+H^+	－0.32	Cyt c_1 Fe^{3+}/Fe^{2+}	0.22
FMN/$FMNH_2$	－0.219	Cyt c Fe^{3+}/Fe^{2+}	0.254
FAD/$FADH_2$	－0.219	Cyt a Fe^{3+}/Fe^{2+}	0.29
Cyt b_L（b_H）Fe^{3+}/Fe^{2+}	0.05（0.10）	Cyt a_3 Fe^{3+}/Fe^{2+}	0.35
$Q_{10}/Q_{10}H_2$	0.06	$1/2O_2/H_2O$	0.816

目前认为，氧化呼吸链分为两条途径。一条称为 NADH 氧化呼吸链，该途径从 NADH+H^+开始到还原 O_2 生成 H_2O。电子传递顺序模式是：

NADH→复合体Ⅰ→CoQ→复合体Ⅲ→复合体Ⅳ→O_2

另一条称为 $FADH_2$ 氧化呼吸链，即底物脱下 2H 直接或间接转给 FAD 生成 $FADH_2$，再经泛醌到还原 O_2 生成 H_2O。习惯称琥珀酸氧化呼吸链。电子传递顺序模式是：

琥珀酸→复合体Ⅱ→CoQ→复合体Ⅲ→复合体Ⅳ→O_2

二、氧化磷酸化将氧化呼吸链释能与 ADP 磷酸化生成 ATP 偶联

在机体能量代谢中，ATP 作为能量载体分子，是体内主要供能的高能化合物。细胞内由 ADP 磷酸化生成 ATP 的方式有两种，一种是与脱氢反应偶联，直接将高能代谢物分

子中的能量转移至 ADP（或 GDP），生成 ATP（或 GTP）的过程，称为底物水平磷酸化，已在糖代谢中叙述。而 ATP 形成的主要方式是氧化磷酸化（oxidative phosphorylation），即由代谢物脱下的氢，经线粒体氧化呼吸链电子传递释放能量，偶联驱动 ADP 磷酸化生成 ATP 过程，因此又称为偶联磷酸化。

（一）氧化磷酸化偶联部位在复合体Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ内

理论推测的氧化呼吸链中偶联生成 ATP 的部位称为氧化磷酸化的偶联部位，可根据下述实验方法及数据大致确定。

1. P/O 比值 P/O 比值是指氧化磷酸化过程中，每消耗 1/2 摩尔 O_2 所生成 ATP 的摩尔数（或一对电子通过氧化呼吸链传递给氧所生成 ATP 分子数）。实验证实，丙酮酸等底物脱氢反应产生 $NADH+H^+$，通过 NADH 氧化呼吸链传递，P/O 比值接近 3，说明 NADH 氧化呼吸链存在 3 个 ATP 生成部位。而琥珀酸脱氢时，P/O 比值接近 2，说明琥珀酸氧化呼吸链存在 2 个 ATP 生成部位。提示一个 ATP 生成部位应在 NADH 和泛醌之间。而抗坏血酸底物直接通过 Cyt c 传递电子进行氧化，P/O 比值接近 1，推测 Cyt c 和 O_2 之间应存在 ATP 生成部位，而另一 ATP 生成部位在泛醌和 Cyt c 之间。近年实验证实，一对电子经 NADH 氧化呼吸链传递，P/O 比值约为 2.5，一对电子经琥珀酸氧化呼吸链传递，P/O 比值约为 1.5。

2. 自由能变化 根据热力学公式，pH7.0 时标准自由能变化（$\Delta G^{\ominus}$）与还原电位变化（$\Delta E^{\ominus}$）之间有以下关系：

$$\Delta G^{\ominus} = -nF\Delta E^{\ominus}$$

n 为传递电子数；F 为法拉第常数（96.5kJ/mol·V）。

从 NAD^+ 到 CoQ 段测得的还原电位差约 0.36V，从 CoQ 到 Cyt c 电位差为 0.19V，从 Cyt a、a_3 到分子氧为 0.58V，分别对应复合体Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ的电子传递。计算结果，它们相应的 $\Delta G^{\ominus}$ 分别约为 −69.5、−36.7、−112kJ/mol，而生成每摩尔 ATP 需能约 30.5kJ（7.3kcal），可见以上三部位均足够提供生成 ATP 所需的能量。说明在复合体Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ内，各存在一个 ATP 生成部位。

（二）氧化磷酸化偶联机制是产生跨线粒体内膜的质子梯度

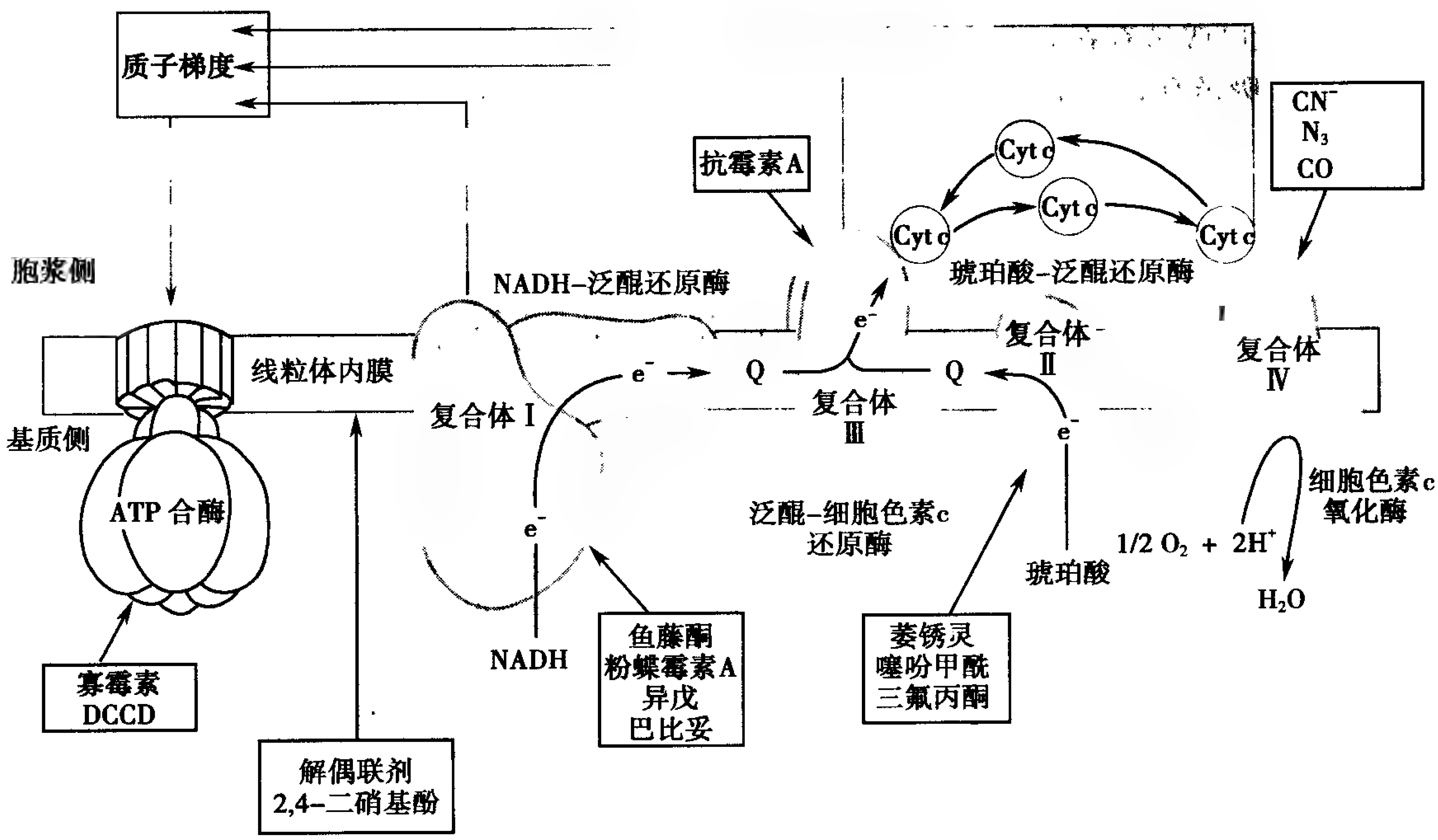
阐明氧化磷酸化偶联机制的化学渗透假说（chemiosmotic hypothesis）是 1961 年由英国科学家 P. Mitchell 提出的，其基本要点是电子经呼吸链传递时，驱动质子从线粒体内膜的基质侧转移到内膜胞质侧，形成跨线粒体内膜的质子电化学梯度（H^+ 浓度梯度和跨膜电位差），以此储存电子传递释放的能量。当质子顺浓度梯度回流基质时驱动 ADP 与 Pi 生成 ATP。

化学渗透理论阐明了氧化磷酸化偶联机制

英国学者 P. Mitchell 获得 1978 年诺贝尔化学奖，表彰他创建的化学渗透理论阐明了氧化磷酸化的偶联机制。他提出电子传递能量驱动质子从线粒体基质转移到内膜外，形成跨内膜质子梯度，储存能量，质子通过 ATP 合酶内流释能催化 ATP 合成。该理论解释了氧化磷酸化中电子传递链蛋白、ATP 合酶在隔离基质的内膜分布的意义及其如何有利于用质子作为能源。这一理论是解决该生物能学难题的重大突破，并更新人们对涉及生命现象的生物能储存、生物合成、代谢物转运、膜结构功能等多种问题的认识。

化学渗透假说已经得到广泛的实验支持：①氧化磷酸化依赖于完整封闭的线粒体内膜；②线粒体内膜对 H^+、OH^-、K^+、Cl^- 离子是不通透的；③电子传递链可驱动质子移出线粒体，形成可测定的跨内膜电化学梯度；④增加线粒体内膜外侧酸性可导致 ATP 合成，而线粒体内膜加入使质子通过物质可减少内膜质子梯度，结果电子虽可以传递，但 ATP 生成减少。

氧化呼吸链电子传递过程驱动质子从线粒体内膜基质侧转移到胞质侧的机制在上文已有叙述，但还不完全清楚。实验证实电子传递过程复合体Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ有质子泵功能，一对电子经这些复合体传递分别向内膜胞质侧泵出 $4H^+$、$4H^+$ 和 $2H^+$。图 6-11 归纳了氧化呼吸链电子传递和氧化磷酸化的过程。



● 图 6-11　化学渗透假说示意图及各种抑制剂对电子传递链的影响

（三）质子顺梯度回流释放能量被 ATP 合酶利用催化 ATP 合成

从线粒体内膜分离的氧化呼吸链复合体还包括复合体Ⅴ（complex Ⅴ），即 ATP 合酶（ATP synthase）。ATP 合酶主要由 F_1（亲水部分）和 F_0（疏水部分）组成。F_1 为线粒体内膜的基质侧颗粒状突起，催化 ATP 合成。动物细胞线粒体 F_1 部分由 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ 亚基复合体和 OSCP、IF_1 等亚基组成，OSCP 即寡霉素敏感蛋白（oligomycin sensitive conferring protein，OSCP），IF_1 可调节 ATP 合成。$\alpha_3\beta_3$ 亚基间隔排列形成六聚体。α、β 亚基是同源蛋白，每组 αβ 结合 1 分子 ATP，形成 αβ 功能单元。催化部位在 β 亚基中，但 β 亚基必须与 α 亚基结合才有活性。F_0 镶嵌在线粒体内膜中。它由疏水的 a、b_2、$c_{9\sim12}$ 亚基组成，形成跨内膜质子通道。动物细胞线粒体 F_0 还有其他辅助亚基。c 亚基为脂蛋白，由短环连接的 2 个反向跨膜 α-螺旋组成，9～12 个 c 亚基围成环状结构，a 亚基紧靠 c 亚基环外侧，含 5 个跨膜 α-螺旋并形成 2 个不穿膜、不连通的亲水性质子半通道，分别开口于内膜基质侧和胞质侧。两半通道分别与 1 个 c 亚基相对应（图 6-12）。

现在认为，ATP 合酶组成可旋转的发动机样结构，F_0 的 2 个 b 亚基通过长亲水头部域的一端锚定 F_1 的 α 亚基，其另端通过 δ 和 $\alpha_3\beta_3$ 稳固结合，使 a、b_2 和 $\alpha_3\beta_3$、δ 亚基组成

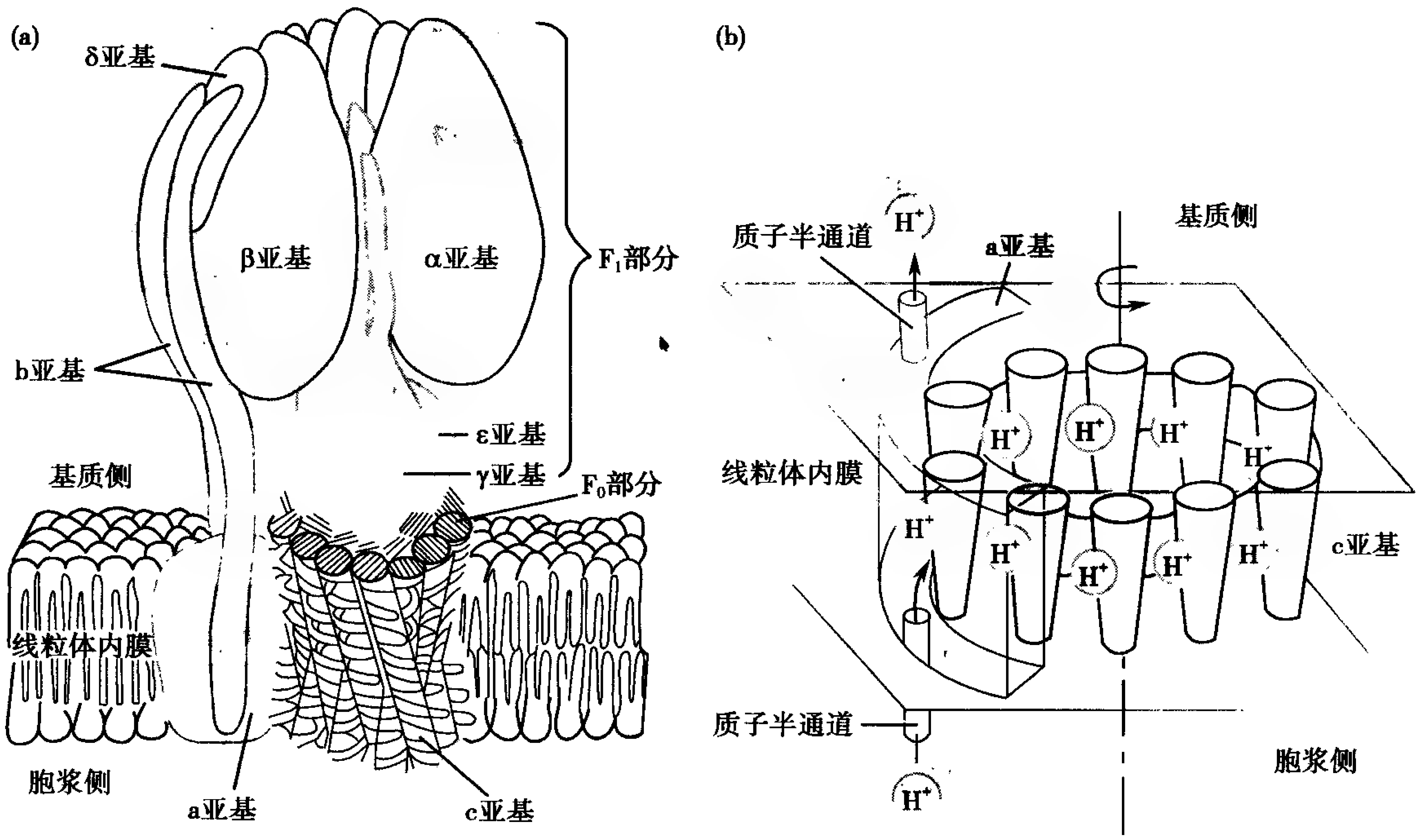


图 6-12 ATP 合酶结构和质子的跨内膜流动机制模式图

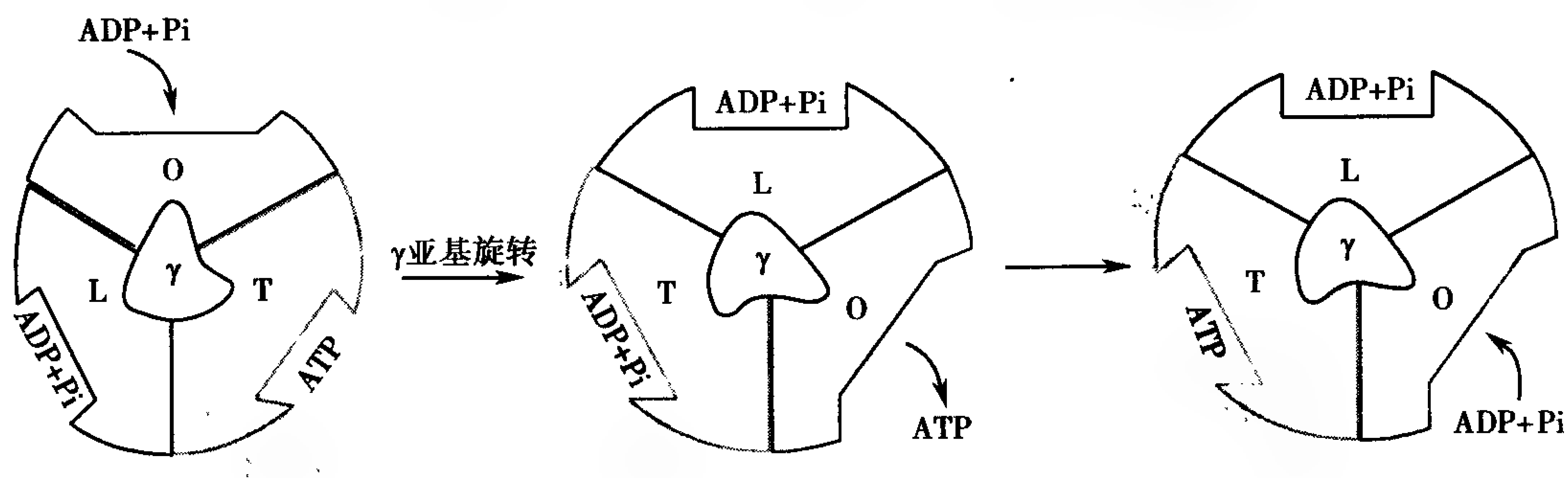
(a) F_0-F_1 复合体组成可旋转的发动机样结构，F_1 的 α_3、β_3 和 δ 亚基以及 F_0 的 a、b_2 亚基共同组成定子部分，而 F_0 的 γ、ε 亚基及 F_1 的 c 亚基环组成转子部分；(b) F_0 的 a 亚基有 2 个质子半通道，分别开口内膜两侧，并对应与 1 个 c 亚基相互作用，质子顺梯度从胞浆侧进入，结合 c 亚基，旋转到另一半通道从基质侧排出

稳定的定子部分。部分 γ 和 ε 亚基共同形成穿过 $\alpha_3\beta_3$ 间中轴，γ 还与 1 个 β 亚基疏松结合作用，下端与嵌入内膜的 c 亚基环紧密结合。c 亚基环、γ 和 ε 亚基组成转子部分。当质子顺梯度穿内膜向基质回流时，转子部分能相对定子部分旋转，使 ATP 合酶利用释放的能量合成 ATP。质子梯度强大势能驱动质子从 a 亚基胞质侧进入半通道，使对应的 1 个 c 亚基必需残基 Asp61 所带负电荷被 H^+ 中和后，c 亚基能与疏水内膜相互接触而发生转动，当其转到接触出口半通道相应 c 亚基位置时，Asp61 原结合的 H^+ 从半通道出口顺梯度释放进入线粒体基质（图 6-12）。同理，各 c 亚基可依次进行上述循环，导致 c 环和 γ、ε 亚基相对 $\alpha_3\beta_3$ 转动。在转动中 γ 亚基和各 β 亚基间相互作用发生周期性变化，使每个 β 亚基活性中心构象循环改变。

P. Boyer 提出 ATP 合成的结合变构机制（binding change mechanism），β 亚基有 3 型构象：开放型（O）无活性，与配体亲和力低；疏松型（L）无活性，与 ADP 和 Pi 底物疏松结合。紧密型（T）有 ATP 合成活性，和配体高亲和。ATP 合酶 3 组 αβ 单元各自在 γ 亚基转动时构象循环变化，ADP 和 Pi 底物结合于 L 型 β 亚基，质子流能量驱动该 β 亚基变构为 T 型，则合成 ATP，再到 O 型，则该 β 亚基释放出 ATP（图 6-13）。3 个 β 亚基依次经同样循环生成、释出 ATP，质子流能量主要用于驱动 β 亚基构象改变使 ATP 从活性中心释放。转子循环一周生成 3 分子 ATP，推测约需 3 个质子穿线粒体内膜回流进基质能生成 1 分子 ATP。

Boyer 破解 ATP 合成的可逆“结合变构”机制

美国科学家 P. D. Boyer 获得 1997 年诺贝尔化学奖，他的卓越成就是破解了 ATP 合酶催化的分子机制。膜结合的 ATP 合酶存在于各种生物中，高度保守。Boyer 等研究者应用化学衍生、构象探针、^{18}O 交换磷酸、定位突变等创新性实验技术，证明 ATP 合成可逆的“结合变构”机制（the binding change mechanism）：质子流能量主要促进酶紧密结合的 ATP 释放，酶内小亚基旋转驱动强制外周 3 个 β 催化亚基依次结合变构。有趣的是 ATP 合酶是催化伴随亚基旋转的分子水平小机械，荧光蛋白标记 ATP 合酶的旋转已被实验直接显示证明。



转化

● 图 6-13　ATP 合酶的工作机制

三个 β 亚基构象不同：O 开放型；L 疏松型；T 紧密结合型质子回流驱动 γ 亚基旋转及 β 亚基构象相互转化

三、氧化磷酸化作用可受某些内外源因素影响

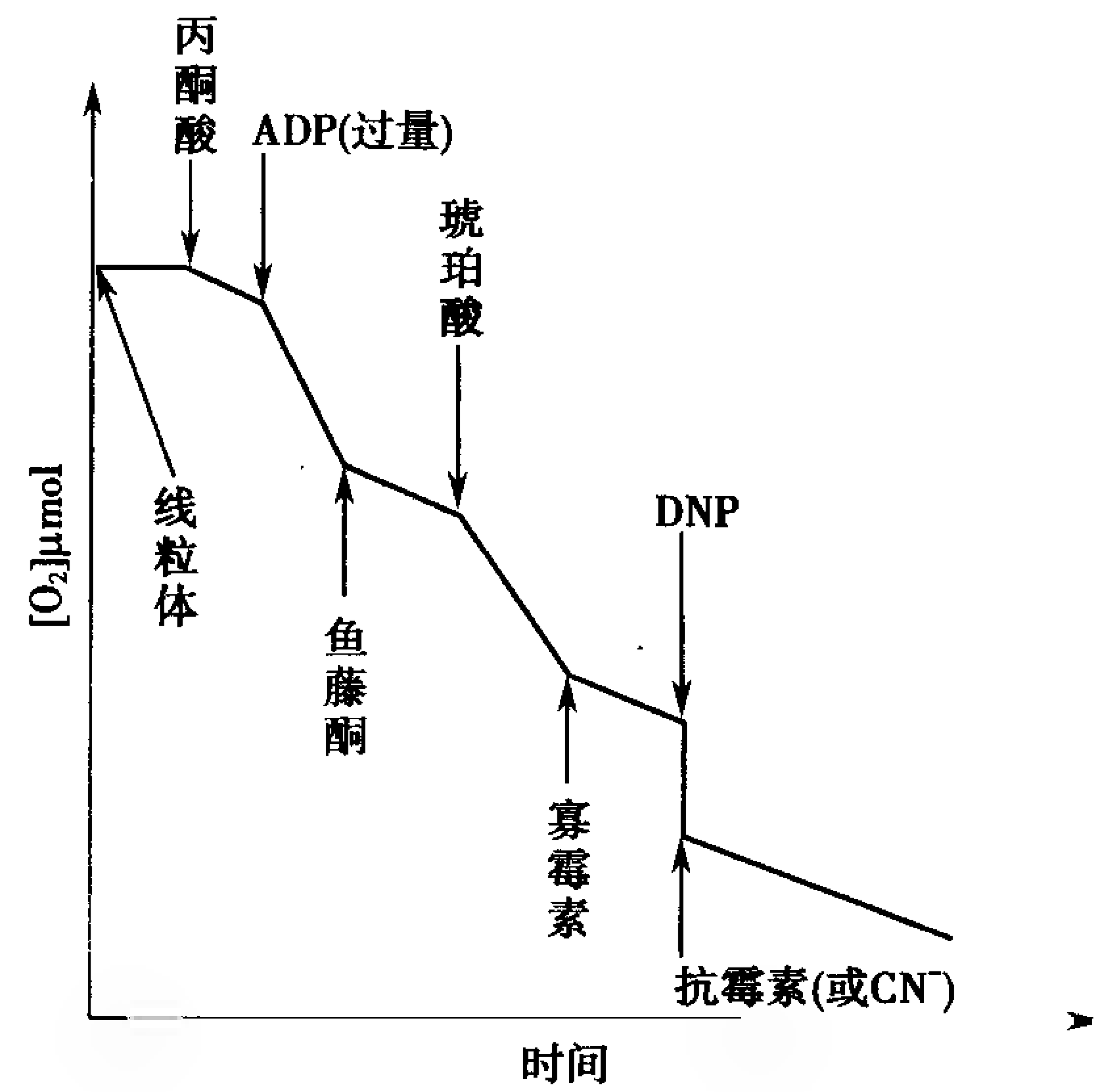
（一）有 3 类氧化磷酸化抑制剂

1. 呼吸链抑制剂阻断氧化磷酸化的电子传递过程　此类抑制剂能在特异部位阻断氧化呼吸链中电子传递。例如，鱼藤酮（rotenone）、粉蝶霉素 A（piericidin A）及异戊巴比妥（amobarbital）等可阻断复合体Ⅰ中从铁硫中心到泛醌的电子传递。萎锈灵（carboxin）是复合体Ⅱ的抑制剂。抗霉素 A（antimycin A）阻断 Cyt b_H 到泛醌（Q_N）间电子传递。粘噻唑菌醇则作用 Q_P 位点，都是复合体Ⅲ抑制剂。CN^-、N^{3-} 可紧密结合复合体Ⅳ中氧化型 Cyt a_3，阻断电子由 Cyt a 到 Cu_B-Cyt a_3 间传递。CO 与还原型 Cyt a_3 结合，阻断电子传递给 O_2。目前发生的城市火灾事故中，由于装饰材料中的 N 和 C 经高温可形成 HCN，因此伤员除因燃烧不完全造成 CO 中毒外，还存在 CN 中毒。此类抑制剂可使细胞内呼吸停止，与此相关的细胞生命活动停止，引起机体迅速死亡（图 6-11）。

2. 解偶联剂破坏电子传递建立的跨膜质子电化学梯度　解偶联剂（uncoupler）可使氧化与磷酸化的偶联相互分离，基本作用机制是破坏电子传递过程建立的跨内膜的质子电化学梯度，使电化学梯度储存的能量以热能形式释放，ATP 的生成受到抑制。如二硝基苯酚（dinitrophenol，DNP）为脂溶性物质，在线粒体内膜中可自由移动，进入基质侧时释出 H^+，返回胞质侧时结合 H^+，从而破坏了电化学梯度。机体内源性解偶联剂能使组织产热，如人（尤其是新生儿）、哺乳类动物中存在含有大量线粒体的棕色脂肪组织，该

组织线粒体内膜中存在丰富的解偶联蛋白（uncoupling protein，UCP_1），它是由 2 个 32kD 亚基组成的二聚体，在内膜上形成易化质子通道，H^+ 可经此通道返回线粒体基质中，通过氧化磷酸化解偶联释放热能，因此棕色脂肪组织是产热御寒组织。新生儿硬肿症是因为缺乏棕色脂肪组织，不能维持正常体温而使皮下脂肪凝固所致。发现在骨骼肌等组织的线粒体还有 UCP_1 的同源蛋白 UCP_2、UCP_3，在禁食条件下表达增加，无解偶联作用，可能有代谢调节物及肥胖相关因子的功能。体内游离脂酸也可促进质子经解偶联蛋白反流至线粒体基质中。

3. ATP 合酶抑制剂同时抑制电子传递和 ATP 的生成 这类抑制剂对电子传递及 ADP 磷酸化均有抑制作用。例如寡霉素（oligomycin）可结合 F_0 单位，二环已基碳二亚胺（dicyclohexyl carbodiimide，DCCP）共价结合 F_0 的 c 亚基谷氨酸残基，阻断质子从 F_0 质子半通道回流，抑制 ATP 合酶活性。由于线粒体内膜两侧质子电化学梯度增高影响呼吸链质子泵的功能，继而抑制电子传递。各种抑制剂对离体线粒体耗氧的影响见图 6-14。



● **图 6-14 不同底物和抑制剂对线粒体氧耗的影响**
纵轴为氧电极测定氧浓度，观察离体线粒体耗氧量

（二）ADP 是调节正常人体氧化磷酸化速率的主要因素

正常机体氧化磷酸化速率主要受 ADP 调节，由于呼吸链的电子传递和 ATP 生成紧密偶联、相互依赖，氧化呼吸链中 ATP 生成既以电子传递为前提，又能推动电子传递过程。完整线粒体只有底物 ADP 和 Pi 充足时电子传递才能以高水平传递。机体 ATP 利用增加，ADP 浓度升高，进入线粒体后使氧化磷酸化加速。相反，ADP 减少，氧化磷酸化速度减慢。通过调节使 ATP 的生成速度适应生理需要。

（三）甲状腺激素刺激机体耗氧量和产热同时增加

甲状腺激素诱导细胞膜上 Na^+，K^+-ATP 酶的生成，使 ATP 加速分解为 ADP 和 Pi，ADP 增多促进氧化磷酸化。甲状腺激素（T3）还可诱导解偶联蛋白基因表达，引起物质氧化释能和产热比率均增加，ATP 合成减少，所以甲状腺功能亢进症患者基础代谢率增高。

（四）线粒体 DNA 突变可影响机体氧化磷酸化功能

线粒体 DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）呈裸露的环状双螺旋结构，缺乏蛋白质保护和损伤修复系统，容易受到本身氧化磷酸化过程中产生的氧自由基的损伤而发生突变，突变率远高于核 DNA。mtDNA 线粒体可表达呼吸链复合体中 13 个亚基以及线粒体内 22 个 tRNA 和 2 个 rRNA。因此 mtDNA 突变可影响氧化磷酸化的功能，使 ATP 生成减少而致病。mtDNA 病出现的症状取决于 mtDNA 突变部位、突变的程度和各器官对 ATP 的需求，功能障碍先出现于耗能较多的组织。随年龄增长，mtDNA 突变严重累积，可与帕金森症、老年性痴呆等退行性疾病的发生相关。因每个卵细胞中有几十万个 mtDNA分子，每个精子中只有几百个 mtDNA 分子，受精卵 mtDNA 主要来自卵细胞，对 mtDNA 影响较大，因此 mtDNA 病以母系遗传居多。

四、ATP 在能量的生成、利用、转移和储存中起核心作用

生物体能量代谢有明显的特点。其一，细胞生物大分子体系多通过弱键能的非共价键维系，因此生物体不能承受能量大量增加、能量大量释放的化学过程，故代谢反应都是依序进行、能量逐步得失的反应。

其二，生物体不直接利用营养物质的化学能，而需要使之转移成细胞可以利用的能量形式，即 ATP 等高能有机磷酸化合物的化学能，当机体需要时，再由这些高能磷酸化合物直接为生理活动供能，有利于细胞可对能量代谢进行严格调控。所谓高能磷酸化合物是指那些水解时有较大自由能释放的磷酸化合物。一般 $\Delta E^{\ominus}$（大于（或等于）ATP（或大于 21kJ/mol）的磷酸化合物称为高能磷酸化合物，将这些水解时释放能量较多的磷酸酯键，称之为高能磷酸键，常用"～ P"符号表示。水解时产生的 $\Delta G^{\ominus}$ 小于 ATP 的化合物，称为低能磷酸化合物。实际上，高能磷酸键水解时释放的能量是整个高能磷酸化合物分子释放的能量，并不存在键能特别高的化学键。生物体内常见的高能化合物包括高能磷酸化合物和含有辅酶 A 的高能硫酯化合物等（表 6-3）。

表 6-3　一些重要有机磷酸化合物水解释放的标准自由能

化　合　物	$\Delta E^{\ominus}$	
	kJ/mol	(kcal/mol)
磷酸烯醇式丙酮酸	－61.9	(－14.8)
氨基甲酰磷酸	－51.4	(－12.3)
1,.3-二磷酸甘油酸	－49.3	(－11.8)
磷酸肌酸	－43.1	(－10.3)
ATP →ADP＋Pi	－30.5	(－7.3)
乙酰辅酶 A	－31.5	(－7.5)
ADP →AMP＋Pi	－27.6	(－6.6)
焦磷酸	－27.6	(－6.6)
1-磷酸葡萄糖	－20.9	(－5.0)

其三，ATP 是最重要的高能磷酸化合物。是细胞可以直接利用的最主要能量形式。营养物分解产生能量的大约 40%被转化为 ATP 的化学能。在体内能量代谢中，以 ATP 末端的磷酸键最为重要，该键水解释放的能量处于各种磷酸化合物磷酸键释放能量的中间位置。有利于 ATP 在能量转移时发挥重要作用。既可以从其他更高能化合物中转移能量生成 ATP，又可直接利用 ATP 水解反应偶联以驱动那些需要输入自由能的反应。ATP 在生物能学上最重要的意义在于，通过其释放大量自由能的水解反应和各种耗能生命过程偶联，使偶联反应"净过程"成为热力学有利的过程，使这些反应在生理条件下可以进行。ATP 的末端磷酸基及相应自由能可被分解或转移，生成 ADP；或利用 ATP 的另一个高能磷酸键，生成 AMP 和 PP_i。在细胞中，ATP 和 ADP 的全部磷酸基都处于解离状态，显示 ATP^{4-} 和 ADP^{3} 的多电荷负离子形式，并与细胞内 Mg^{2+} 形成复合物。在标准状态下 ATP 水解自由能释放为－30.5kJ/mol（－7.3kcal/mol）。但在活细胞中，ATP、ADP 和无机磷浓度比标准状态低得多，而 pH 比标准状态 7.0 高，在各种因素影响下，ATP 水解释放自由能可能达到－52.3kJ/mol（－12.5kcal/mol）。

ATP在体内能量捕获、转移、储存和利用过程中处于中心位置。细胞中存在的腺苷

酸激酶（adenylate kinase）可催化 ATP、ADP、AMP 间互变。

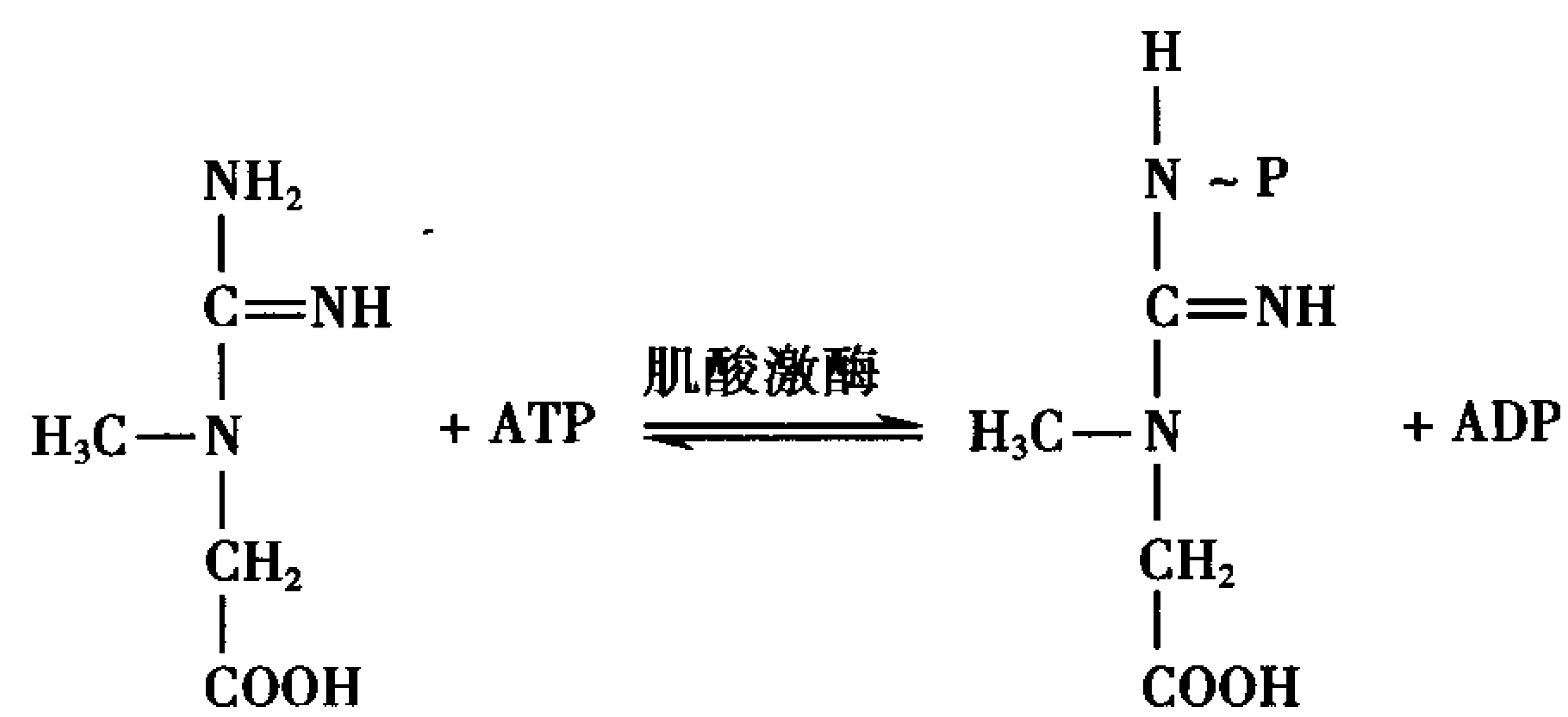
$$ATP + AMP \longrightarrow 2ADP$$

当体内 ATP 消耗过多（例如肌肉剧烈收缩）时，ADP 累积，在腺苷酸激酶催化下由 ADP 转变成 ATP 被利用。当 ATP 需要量降低时，AMP 从 ATP 中获得～P 生成 ADP。

UTP、CTP、GTP 可为糖原、磷脂、蛋白质等合成提供能量，但它们一般不能从物质氧化过程中直接生成，只能在核苷二磷酸激酶的催化下，从 ATP 中获得～P 产生。反应如下：

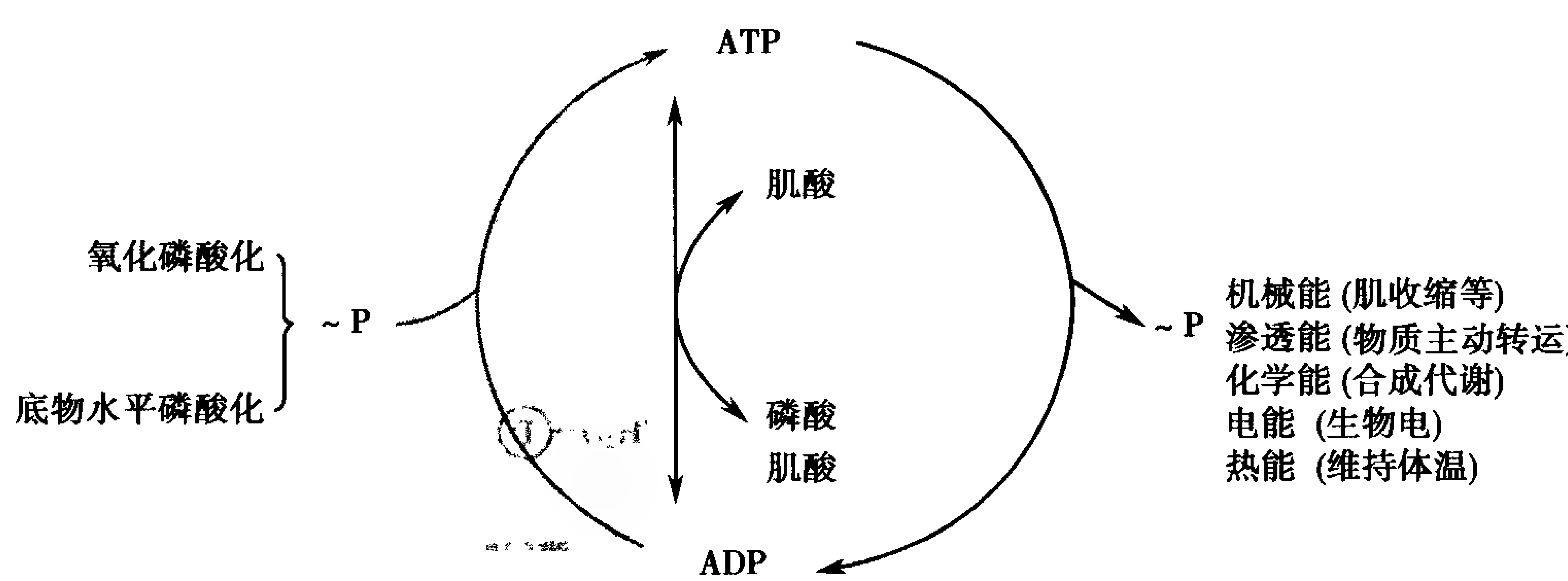
$$ATP + UDP \longrightarrow ADP + UTP$$
$$ATP + CDP \longrightarrow ADP + CTP$$
$$ATP + GDP \longrightarrow ADP + GTP$$

磷酸肌酸（creatine phosphate，CP）作为高能键能量储存形式，存在于需能较多的骨骼肌、心肌和脑中。ATP 充足时，通过转移末端～P 给肌酸，生成磷酸肌酸。当迅速消耗 ATP 时，磷酸肌酸可将～P 转移给 ADP，生成 ATP，补充 ATP 的不足（图 6-15）。



● 图 6-15 高能磷酸键在 ATP 和肌酸间的转移

实际上，生物体内能量的生成和利用都以 ATP 为中心。ATP 作为能量载体分子，在分解代谢中产生，又在合成代谢等耗能过程中利用，ATP 分子性质稳定，但不在细胞中储存，寿命仅数分钟，而是不断进行 ADP-ATP 的再循环，伴随自由能的释放和获得，完成不同生命过程间能量的穿梭转换，因此称为“能量货币”。营养物质分解代谢释放的能量很大部分需转变为 ATP 的化学能，ATP 水解释放的自由能又可被机体各种生命活动直接利用，如各种代谢物的活化反应，合成生物大分子反应过程，通过 ATP 使分解代谢与合成代谢紧密联系。ATP 也为主动跨膜转运，肌肉收缩、信号转导等生命过程提供能量（图 6-16）。在人体内 ATP 含量虽不多，但每天 ATP/ADP 相互转变的量却十分可观。



● 图 6-16 ATP 的生成、储存和利用

五、线粒体内膜对各种物质进行选择性转运

线粒体基质与胞质之间有线粒体内、外膜相隔，外膜对物质的通透性、选择性低，线粒体内膜有与代谢物转运相关的转运蛋白体系，对各种物质进行选择性转运，以保证生物

氧化和基质内旺盛的物质代谢过程的顺利进行（表 6-4）。

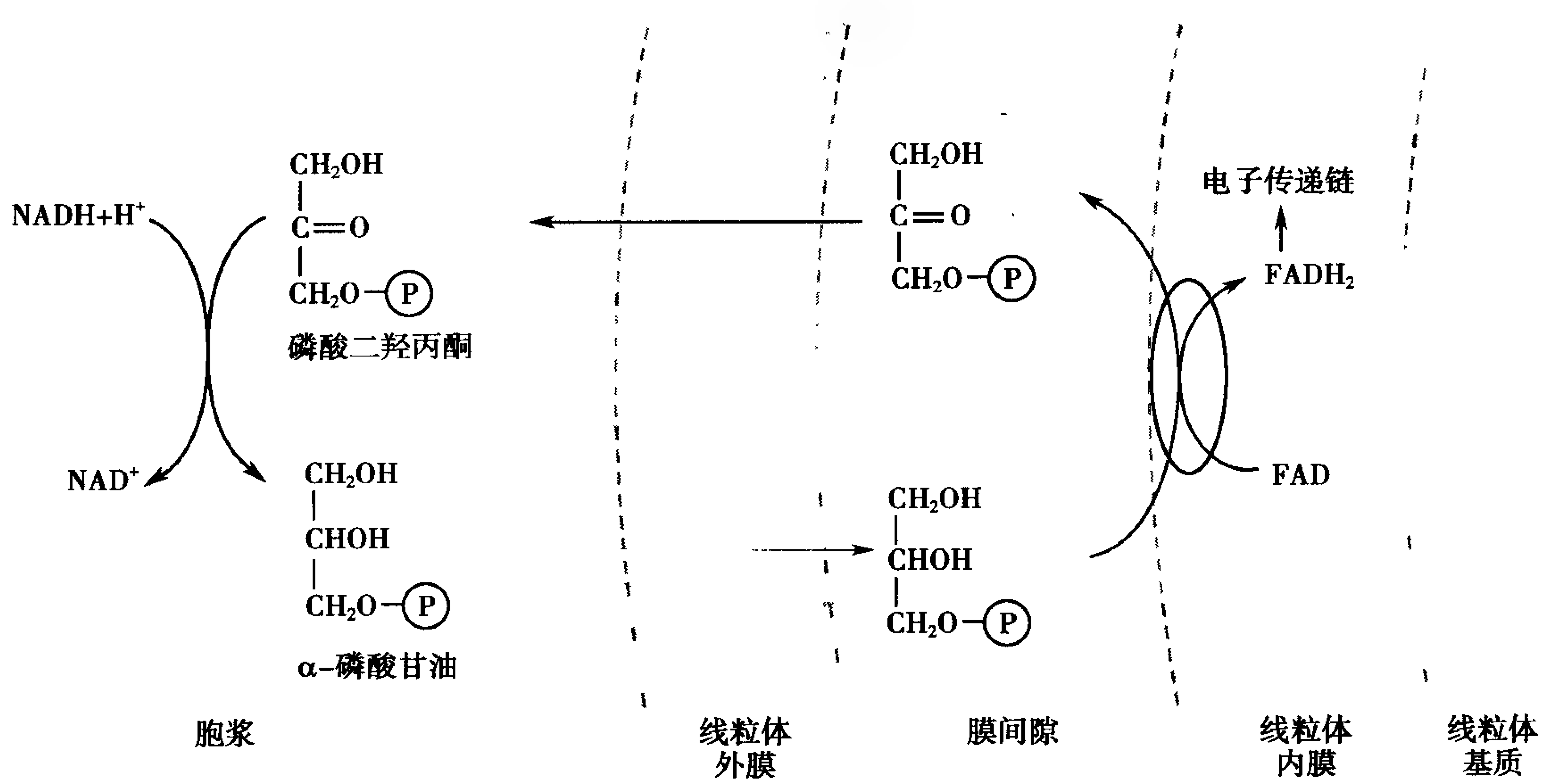
表 6-4　线粒体内膜的某些转运蛋白对代谢物的转运

转运蛋白	进入线粒体	出线粒体
ATP-ADP 转位酶	ADP^{3-}	ATP^{4-}
磷酸盐转运蛋白	$H_2PO_4^- + H^+$	
二羧酸转运蛋白	HPO_4^{2-}	苹果酸
α-酮戊二酸转运蛋白	苹果酸	α-酮戊二酸
天冬氨酸-谷氨酸转运蛋白	谷氨酸	天冬氨酸
单羧酸转运蛋白	丙酮酸	OH^-
三羧酸转运蛋白	苹果酸	柠檬酸
碱性氨基酸转运蛋白	鸟氨酸	瓜氨酸
肉碱转运蛋白	脂酰肉碱	肉碱

（一）胞质中 NADH 通过穿梭机制进入线粒体氧化呼吸链

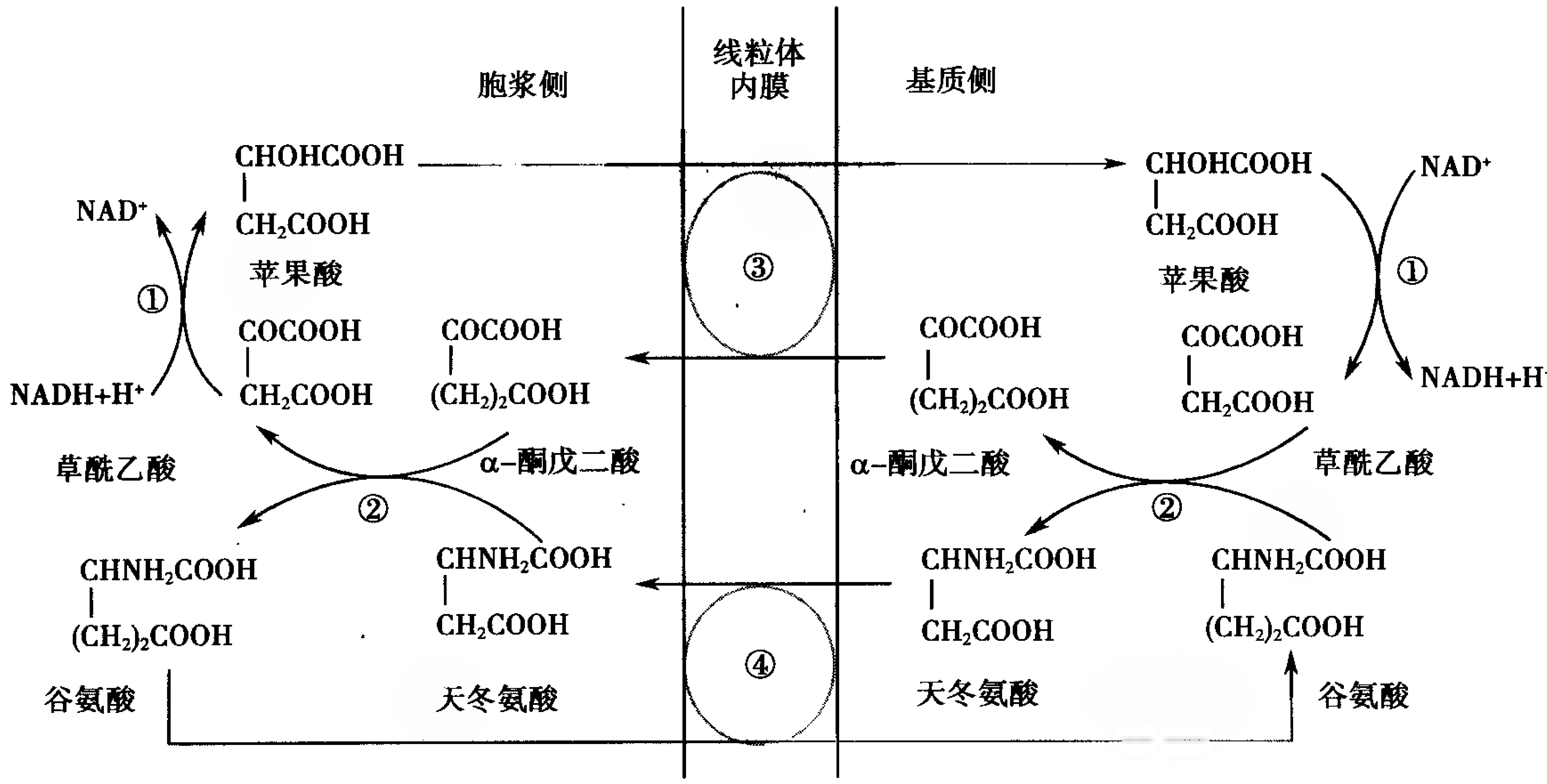
线粒体内生成的 NADH 可直接参加氧化磷酸化过程，但在胞质中生成的 NADH 须通过穿梭机制才能进入线粒体，然后再进入呼吸链进行氧化磷酸化。

1. α-磷酸甘油穿梭主要存在于脑和骨骼肌中　如图 6-17 所示，线粒体外的 $NADH+H^+$ 在胞质中磷酸甘油脱氢酶催化下，使磷酸二羟丙酮还原成 α-磷酸甘油，后者通过线粒体外膜，再经位于线粒体内膜近胞质侧的含 FAD 辅基的磷酸甘油脱氢酶催化下氧化生成磷酸二羟丙酮和 $FADH_2$。$FADH_2$ 直接将 2H 传递给泛醌进入氧化呼吸链（图 6-17）。



● 图 6-17　α-磷酸甘油穿梭

2. 苹果酸-天冬氨酸穿梭主要存在于肝和心肌中　该穿梭涉及 2 种内膜转运蛋白和 4 种酶协同参与。胞质中的 $NADH+H^+$ 脱氢，使草酰乙酸还原成苹果酸，苹果酸进入线粒体后重新生成草酰乙酸和 $NADH+H^+$。$NADH+H^+$ 进入 NADH 氧化呼吸链（图 6-18）。两种穿梭进入呼吸链方式不同，使胞质中 $NADH+H^+$ 生成不同量的 ATP 分子。



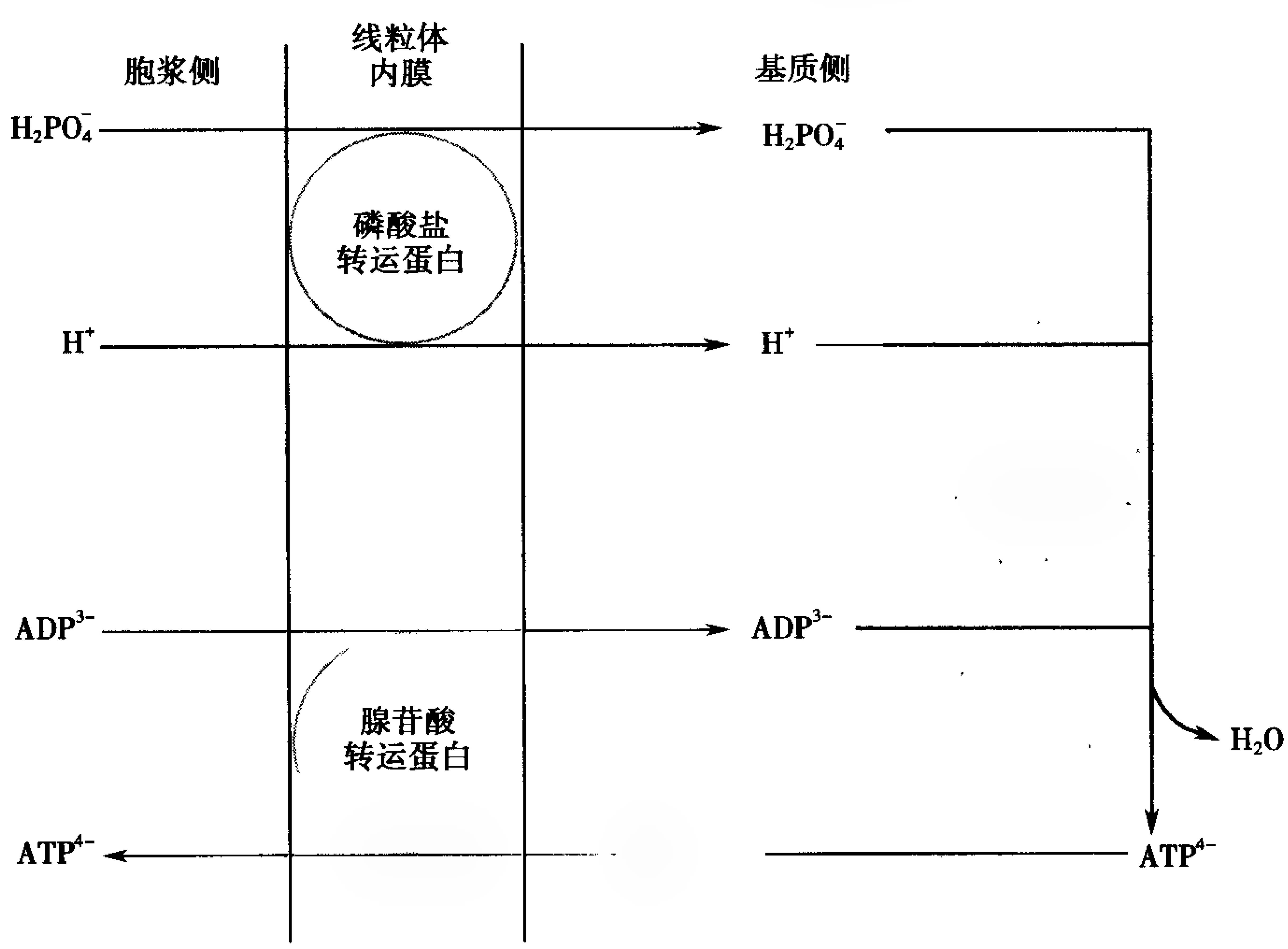
● 图 6-18 苹果酸-天冬氨酸穿梭

①苹果酸脱氢酶；②谷草转氨酶；③α 酮戊二酸转运蛋白；④天冬氨酸 谷氨酸转运蛋白

（二）ATP-ADP 转位酶促进 ADP 进入和 ATP 移出紧密偶联

ATP-ADP 转位酶（ATP-ADP translocase）又称腺苷酸移位酶，富含于线粒体内膜，可占内膜蛋白总量的 14%。它是由 2 个 30kD 亚基组成的二聚体，含一个腺苷酸结合位点，催化经内膜的 ADP^{3-} 进入和 ATP^{4-} 移出紧密偶联，维持线粒体腺苷酸水平基本平衡。此时，胞质中的 $H_2PO_4^-$ 经磷酸盐转运蛋白与 H^+ 同向转运到线粒体内（图 6-19）。

每分子 ATP^{4-} 和 ADP^{3-} 反向转运时，实际向内膜外净转移 1 个负电荷，相当于多 1 个 H^+ 转入线粒体基质，因此每分子 ATP 在线粒体中生成并转运到胞质共需 4 个 H^+ 回流进



● 图 6-19 ATP、ADP、Pi 的转运

入线粒体基质中。按此计算，NADH 氧化呼吸链每传递 2H 泵出 10 H^+，生成约 2.5（10/4）分子 ATP，琥珀酸氧化呼吸链每传递 2H 泵出 $6H^+$，生成 1.5（6/4）分子 ATP。

心肌和骨骼肌等耗能多的组织线粒体膜间隙中存在一种肌酸激酶同工酶，它催化经 ATP-ADP 转位酶运到膜间隙中的 ATP 与肌酸之间～P 转移，生成的磷酸肌酸经线粒体外膜中的孔蛋白进入胞质中。进入胞质中的磷酸肌酸在细胞需能部位由相应的肌酸激酶同工酶催化，将～P 转移给 ADP 生成 ATP，供细胞利用。

第二节　其他不生成 ATP 的氧化体系

一、抗氧化酶体系有清除反应活性氧类的功能

O_2 得到单个电子产生超氧阴离子（O_2^-），超氧阴离子部分还原生成过氧化氢 H_2O_2，H_2O_2 可再经还原反应生成羟自由基（·OH）。这类强氧化成分合称反应活性氧类（reactive oxygen species，ROS）。

$$O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^- \xrightarrow{e^-+2H^+} H_2O_2 \xrightarrow[H_2O]{e^-+H^+} OH \xrightarrow{e^-+H^+} H_2O$$

线粒体氧化呼吸链电子传递过程中漏出的电子与 O_2 结合可产生超氧阴离子 O_2^-，是体内 O_2^- 的主要来源，O_2^- 在线粒体中再通过上述反应生成 H_2O_2 和·OH。细胞过氧化酶体中，FAD 将从脂肪酸等底物获得的电子交给 O_2 生成 H_2O_2 和羟自由基·OH，胞质需氧脱氢酶（如黄嘌呤氧化酶等）也可催化生成 O_2^-。细菌感染、组织缺氧等病理过程，环境、药物等外源因素也可导致细胞产生活性氧类。

活性氧类化学性质活泼，羟自由基活性最强。它们可引起蛋白质、DNA 等各种生物大分子的氧化损伤，甚至破坏细胞的正常结构和功能。线粒体是细胞产生活性氧的主要部位，因此线粒体 DNA 容易受到自由基攻击而损伤或突变，引起相应疾病。机体可以通过抗氧化酶类及时清除活性氧，防止其累积造成有害影响。正常机体存在以下抗氧化酶体系：

过氧化氢酶（catalase）主要存在于过氧化酶体中，其辅基含有 4 个血红素，催化反应如下：

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O+O_2$$

H_2O_2 有一定生理作用，如在粒细胞和吞噬细胞中，H_2O_2 可氧化杀死入侵的细菌；甲状腺细胞中产生的 H_2O_2 可使 $2I^-$ 氧化为 I_2，进而使酪氨酸碘化生成甲状腺激素。

谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GPx）共价结合有其活性所必需的硒（Se）原子。它可去除有氧条件下正常细胞生长和代谢产生的 H_2O_2 和过氧化物（R—O—OH）是体内防止活性氧类损伤的主要酶，它催化的反应如下：

$$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GS—SG$$

$$2GSH + R—O—OH \rightarrow GS—SG + H_2O + R—OH$$

氧化型 GS—SG 经谷胱甘肽还原酶催化，由 $NADH+H^+$ 提供 2H，再转变成还原型谷胱甘肽 GSH。

超氧物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）可催化一分子 O_2^- 氧化生成 O_2，另一分子 O_2^- 还原生成 H_2O_2：

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

哺乳动物细胞有 3 种 SOD 同工酶，在胞外、胞质中，有活性中心含 Cu/Zn 离子的 Cu/Zn-SOD；线粒体 SOD 活性中心含 Mn^{2+}，称 Mn-SOD。生成的 H_2O_2 再被活性极强的过氧化氢酶分解。SOD 也是人体防御内、外环境中超氧离子损伤的重要酶。Cu/Zn-SOD 基因缺陷使 O_2^- 不能及时清除而损伤神经元，可引起肌萎缩性侧索硬化症。

体内其他小分子自由基清除剂有维生素 C、维生素 E、β-胡萝卜素、泛醌等。共同组成人体抗氧化体系。

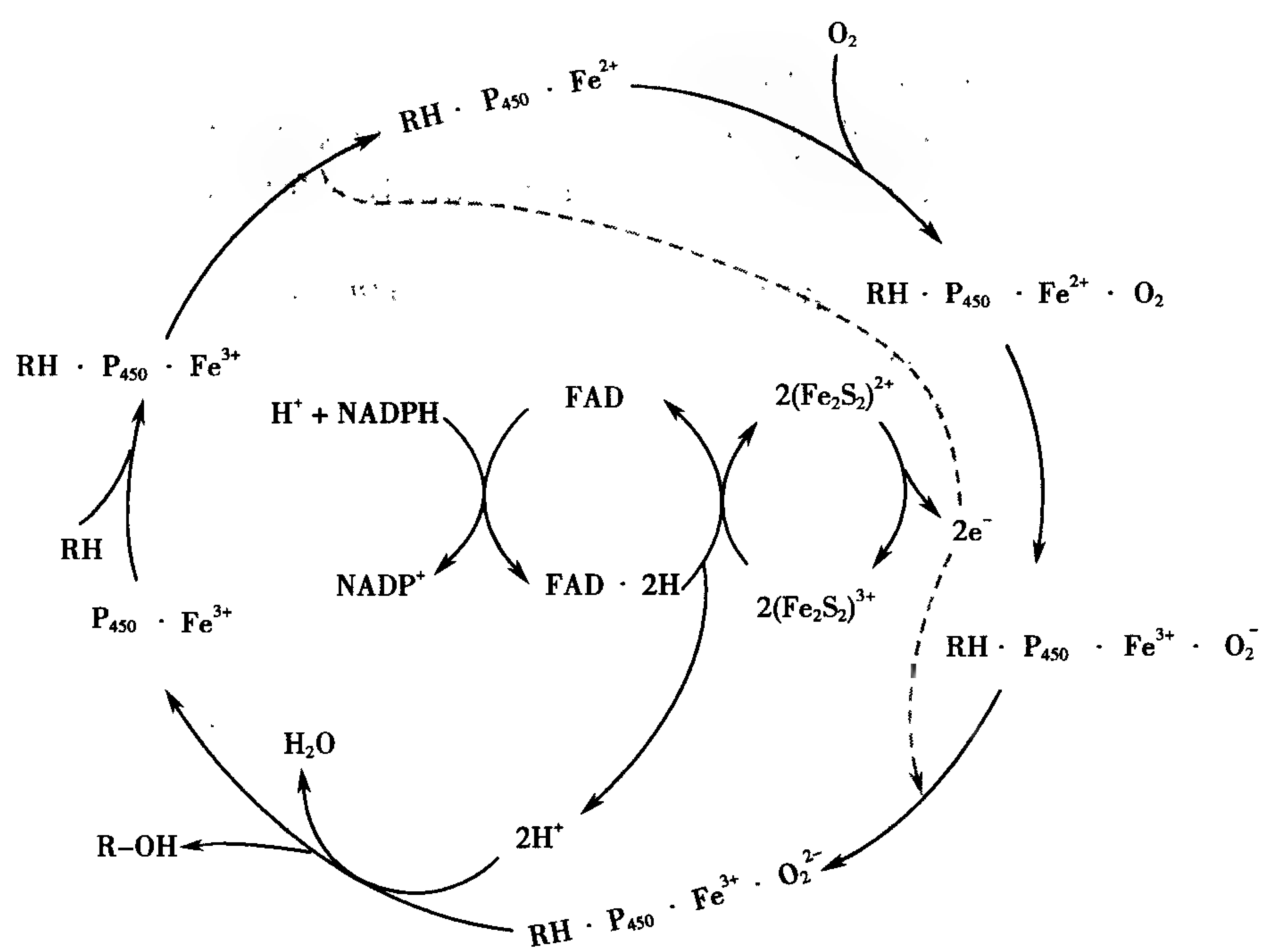
二、微粒体细胞色素 P_{450} 单加氧酶催化底物分子羟基化

人微粒体细胞色素 P_{450} 单加氧酶（cytochrome P_{450} monooxygenase）催化氧分子中的一个氧原子加到底物分子上（羟化），另一个氧原子被氢（来自底物 NADPH＋H^+）还原成水，故又称混合功能氧化酶（mixed function oxidase）或羟化酶（hydroxylase）。参与类固醇激素、胆汁酸及胆色素等的生成以及药物、毒物的生物转化过程（见第十七章）。此酶是含量最丰富、反应最复杂的加氧酶类。

$$RH + NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow ROH + NADP^+ + H_2O$$

上述反应需要细胞色素 P_{450}（cytochrome P_{450}，Cyt P_{450}）参与。Cyt P_{450} 属于 Cyt b 类，还原型 Cyt P_{450} 与 CO 结合后在波长 450nm 处出现最大吸收峰。细胞色素 P_{450} 在生物中广泛分布，哺乳类动物 Cyt P_{450} 分属 10 个基因家族。人 Cyt P_{450} 有几百种同工酶，对被羟化的底物各有其特异性。此酶在肝和肾上腺的微粒体中含量最多，某些组织的线粒体内膜上也存在单加氧酶。

单加氧酶催化反应过程如下：NADPH 首先将电子交给黄素蛋白。黄素蛋白再将电子递给以 Fe-S 为辅基的铁氧还蛋白。与底物结合的氧化型 Cyt P_{450} 接受铁氧还蛋白的 1 个 e 后，转变成还原型 Cyt P_{450}，与 O_2 结合形成 RH・P_{450}・Fe^{2+}・O_2，Cyt P_{450} 铁卟啉中 Fe^{2+}



● 图 6-20 微粒体细胞色素 P_{450} 单加氧酶反应机制

将电子交给 O_2 形成 RH・P_{450}・Fe^{3+}・O_2^-，再接受铁氧还蛋白的第 2 个 e，使氧活化（O_2^{2-}）。此时 1 个氧原子使底物（RH）羟化（ROH），另 1 个氧原子与来自 NADPH 的质子结合生成 H_2O（图 6-20）。

小　结

物质在生物体内氧化称为生物氧化，主要是糖、脂肪、蛋白质等供能物质在体内分解时逐步释放能量，并最终生成 CO_2 和 H_2O 的过程。生物氧化主要在线粒体中进行，线粒体内膜存在多种有氧化还原功能的酶和辅酶排列组成的氧化呼吸链或称电子传递链，可将代谢物脱下的质子、电子逐步传递给氧生成水，并释放物质氧化的能量。从呼吸链分离得到四种功能复合体：NADH 泛醌还原酶（复合体Ⅰ）、琥珀酸-泛醌还原酶（复合体Ⅱ）、泛醌-细胞色素 c 还原酶（复合体Ⅲ）和细胞色素 c 氧化酶（复合体Ⅳ）。CoQ 和 Cyt c 不包含在这些复合体中。

通过测定呼吸链各组分的标准氧化还原电位等方法，可以推测出氧化呼吸链各组分电子传递顺序。根据传递顺序的不同体内存在两条氧化呼吸链：NADH 氧化呼吸链和琥珀酸氧化呼吸链。

体内 ATP 生成的主要方式是氧化磷酸化作用。营养物质分解途径产生的 NADPH＋H^+ 和 $FADH_2$ 提供的氢经 4 种复合体组分的电子传递，最后与 O_2 结合成 H_2O，复合体Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ有质子泵功能，可同时将 H^+ 从线粒体内膜基质侧转移到胞质侧，形成跨线粒体内膜的 H^+ 电化学梯度储存氧化释放的能量。ATP 合酶利用顺梯度回流时释出的势能，驱动 F_0-F_1 复合体旋转 β 亚基构象次序改变，催化 ADP 和 Pi 合成、释放 ATP。计算结果表明，每对氢经 NADH 氧化呼吸链传递产生约 2.5 个 ATP，每对氢经琥珀酸氧化呼吸链传递产生约 1.5 个 ATP。氧化磷酸化抑制剂包括呼吸链抑制剂、解偶联剂和 ATP 合酶抑制剂。此外氧化磷酸化还受细胞内 ADP/ATP 比值以及甲状腺激素的调控。

生物体内能量的生成、转化、储存和利用都以 ATP 为中心。在肌和脑中，磷酸肌酸可作为 ATP 末端高能磷酸键的储存形式。

线粒体内膜通过各种转运蛋白对代谢物进行选择性转运以保证生物氧化顺利进行。胞质中生成的 NADH 不能直接进入线粒体，而必须经 α 磷酸甘油穿梭或苹果酸-天冬氨酸穿梭进入线粒体后才能进行氧化。

体内超氧阴离子等活性氧类对细胞有损伤作用，细胞中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶等组成抗氧化酶体系，能清除体内产生的活性氧类，保护机体。微粒体细胞色素 P_{450} 单加氧酶使底物分子羟化。

（崔　行）

第七章 氨基酸代谢

氨基酸代谢包括合成代谢与分解代谢两方面，本章重点论述分解代谢。在体内，氨基酸的分解需要食物蛋白质来补充，组织的更新也需要食物蛋白质来维持。因此，在讨论氨基酸代谢之前，首先叙述蛋白质的营养作用及蛋白质的消化与吸收。

第一节 蛋白质的营养作用

一、体内蛋白质具有多方面的重要功能

（一）蛋白质维持细胞组织的生长、更新和修补

蛋白质是细胞组织的主要成分。因此，参与构成各种细胞组织是蛋白质最重要的功能。机体只有不断地从膳食中摄取足够量的优质蛋白质，才能维持细胞组织生长、更新和修补的需要。对于处于生长发育时期的儿童及康复期的病人尤为重要。

（二）蛋白质参与体内多种重要的生理活动

体内具有多种特殊功能的蛋白质，例如酶、某些激素、抗体和某些调节蛋白等。肌肉的收缩、物质的运输、血液的凝固等也均由蛋白质来实现。此外，氨基酸代谢过程还可产生胺类、神经递质、嘌呤和嘧啶等重要的含氮化合物。蛋白质和氨基酸的这些功能不能由糖和脂类代替。由此可见，蛋白质是整体生命活动的重要物质基础。

（三）蛋白质可作为能源物质氧化供能

每克蛋白质在体内氧化分解可释放 17.19kJ（4.1kcal）能量。一般来说，成人每日约有 18%的能量从蛋白质获得。但是，蛋白质的这种功能可由糖和脂肪代替。因此，供能是蛋白质的次要功能。

二、体内蛋白质的代谢状况可用氮平衡描述

氮平衡（nitrogen balance）是一种测定摄入氮量与排出氮量，间接反映体内蛋白质代谢状况的实验。蛋白质的含氮量平均约为 16%。摄入的氮量主要来源于食物中的蛋白质，主要用于体内蛋白质的合成，而排出的氮量主要来源于粪便和尿液中的含氮化合物，主要是蛋白质在体内分解代谢的终产物。因此，测定摄入食物中的含氮量和排泄物中的含氮量可以间接了解体内蛋白质合成与分解代谢的状况。人体氮平衡有三种情况，即氮的总平衡、氮的正平衡及氮的负平衡。

氮的总平衡，即摄入氮＝排出氮，反映体内蛋白质的合成与分解处于动态平衡，即氮的“收支”平衡，见于正常成人；氮的正平衡，即摄入氮＞排出氮，反映体内蛋白质的合成大于分解，儿童、孕妇及恢复期的病人属于此种情况；氮的负平衡，即摄入氮＜排出氮，反映体内蛋白质的合成小于分解，见于饥饿、严重烧伤、出血及消耗性疾病患者。

根据氮平衡实验计算，当成人食用不含蛋白质的膳食时，大约 8 天之后，每天排出的氮量逐渐趋于恒定，此时，每公斤体重每日排出的氮量约为 53mg，故一位 60 公斤体重的成人每日蛋白质的最低分解量约为 20g。由于食物蛋白质与人体蛋白质组成的差异，不可

能全部被利用，为了维持氮的总平衡，成人每日蛋白质最低生理需要量为30～50g。要长期保持氮的总平衡，我国营养学会推荐成人每日蛋白质需要量为80g。

三、营养必需氨基酸决定蛋白质的营养价值

根据氮平衡实验证明，人体内有8种氨基酸不能合成。这些体内需要而又不能自身合成，必须由食物提供的氨基酸，称为营养必需氨基酸（nutritionally essential amino acid），包括亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、缬氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。其余12种氨基酸体内可以合成，不必由食物供给，在营养上称为非必需氨基酸（non-essential amino acid）。精氨酸和组氨酸虽然能够在人体内合成，但合成量不多，若长期供应不足或需要量增加也能造成氮的负平衡。因此，有人将这两种氨基酸也归为营养必需氨基酸。

蛋白质的营养价值（nutrition value）是指食物蛋白质在体内的利用率。蛋白质营养价值的高低主要取决于食物蛋白质中必需氨基酸的种类、数量和比例。一般来说，含必需氨基酸种类多、数量足的蛋白质，其营养价值高；反之营养价值低。由于动物性蛋白质所含必需氨基酸的种类和比例与人体需要相近，故营养价值高。与营养价值较低的蛋白质混合食用，彼此间必需氨基酸可以得到互相补充，从而提高蛋白质的营养价值，这种作用称为食物蛋白质的互补作用。例如谷类蛋白质含赖氨酸较少而含色氨酸较多，而豆类蛋白质含赖氨酸较多而含色氨酸较少，两者混合食用即可提高蛋白质的营养价值。某些疾病情况下，为保证病人氨基酸的需要，可输入氨基酸混合液，以防止病情恶化。

第二节　蛋白质的消化、吸收与腐败

一、外源性蛋白质消化成氨基酸和寡肽后被吸收

（一）蛋白质在胃和肠道被消化成氨基酸和寡肽

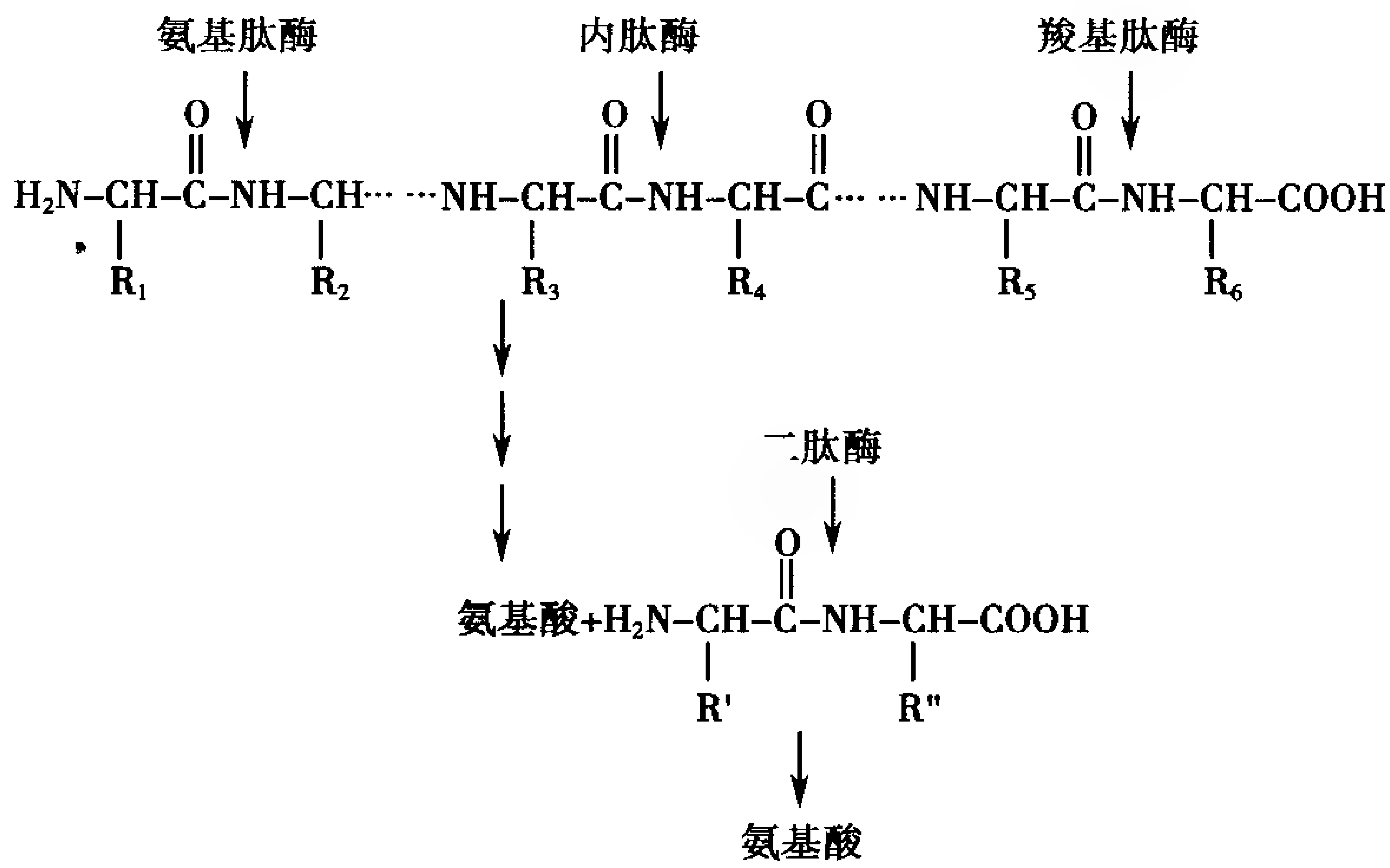
食物蛋白质的消化由胃开始，但主要在小肠进行。食物蛋白质的消化、吸收是体内氨基酸的主要来源。同时，消化过程还可消除食物蛋白质的抗原性，避免引起过敏、毒性反应。

1. 蛋白质在胃中被水解成多肽和氨基酸　食物蛋白质进入胃后经胃蛋白酶（pepsin）作用水解生成多肽及少量氨基酸。胃蛋白酶由胃蛋白酶原（pepsinogen）经胃酸激活生成。胃蛋白酶原由胃黏膜主细胞分泌。胃蛋白酶也能激活胃蛋白酶原转变成胃蛋白酶，称为自身激活作用（autocatalysis）。胃蛋白酶的最适pH为1.5～2.5，酸性的胃液可使蛋白质变性，有利于蛋白质的水解。胃蛋白酶对肽键的特异性较差，主要水解由芳香族氨基酸及甲硫氨酸、亮氨酸等所形成的肽键。胃蛋白酶还具有凝乳作用，可使乳汁中的酪蛋白（casein）与Ca^{2+}形成乳凝块，使乳汁在胃中的停留时间延长，有利于乳汁中蛋白质的消化。

2. 蛋白质在小肠被水解成小肽和氨基酸　食物在胃中的停留时间较短，因此对蛋白质的消化很不完全。蛋白质的消化主要在小肠进行。在小肠中，未经消化或消化不完全的蛋白质受胰液及肠黏膜细胞分泌的多种蛋白酶及肽酶的共同作用，进一步水解成小肽和氨基酸。

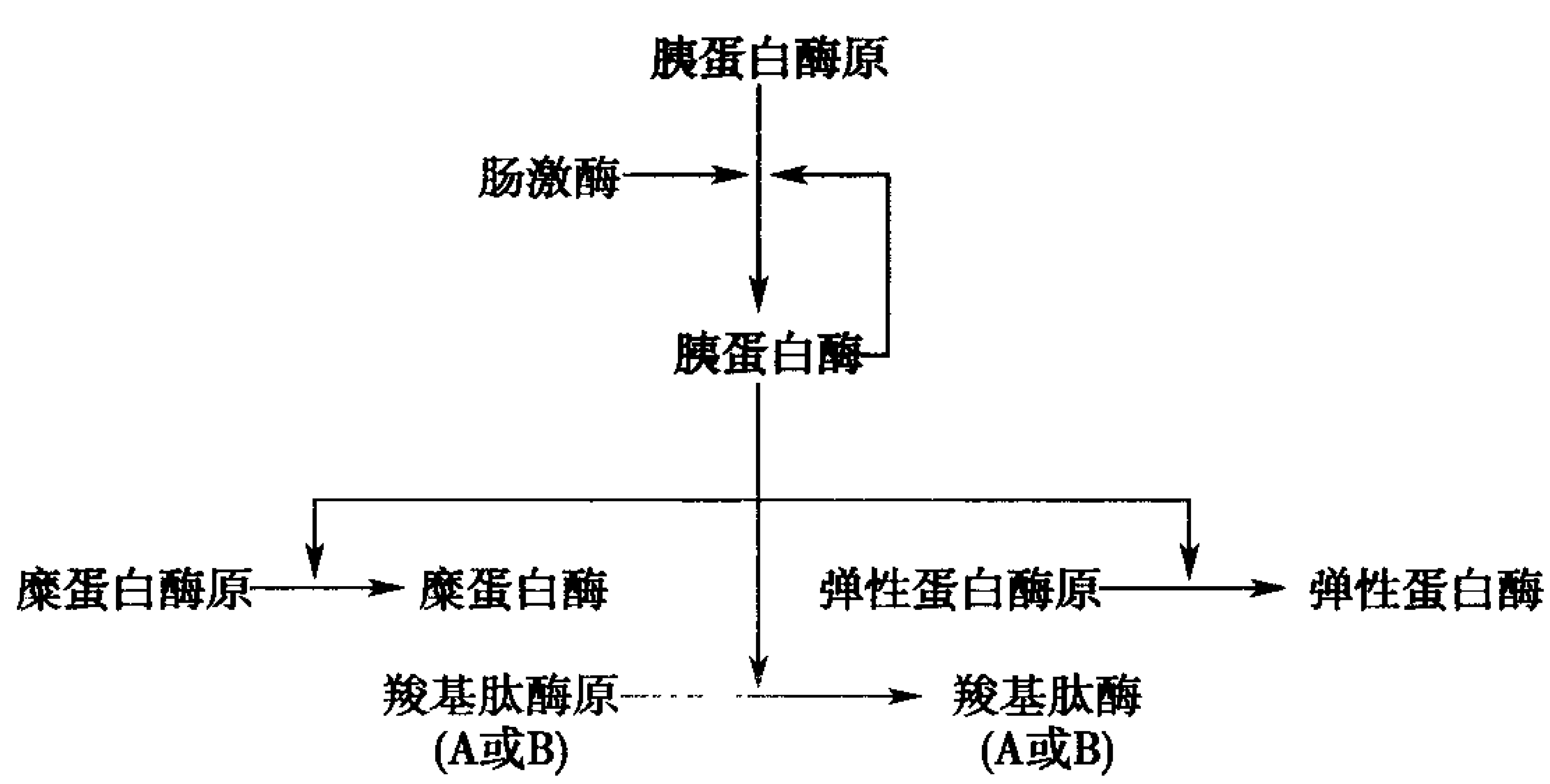
胰液中的蛋白酶基本上分为两大类，即内肽酶（endopeptidase）和外肽酶（exopeptidase）。内肽酶可以特异地水解蛋白质内部的一些肽键，而外肽酶则特异地水解蛋白质或多肽末端的肽键。内肽酶包括胰蛋白酶（trypsin）、糜蛋白酶（chymotrypsin）和弹性蛋

白酶（elastase），这些酶对不同氨基酸组成的肽键有一定的专一性。胰蛋白酶水解由碱性氨基酸的羧基组成的肽键，糜蛋白酶水解由芳香族氨基酸的羧基组成的肽键，而弹性蛋白酶主要水解由脂肪族氨基酸的羧基组成的肽键。外肽酶主要包括羧基肽酶 A（carboxy peptidase A）和羧基肽酶 B，它们自肽链的羧基末端开始，每次水解脱去一个氨基酸，它们对不同氨基酸组成的肽键也有一定的专一性。前者主要水解除脯氨酸、精氨酸、赖氨酸以外的多种氨基酸组成的羧基末端肽键，而后者主要水解由碱性氨基酸组成的羧基末端肽键（图 7-1）。



● 图 7-1　蛋白水解酶作用示意图

无论是内肽酶还是外肽酶，都是以酶原的形式由胰腺细胞分泌，进入十二指肠后胰蛋白酶原由肠激酶（enterokinase）激活。肠激酶由十二指肠黏膜细胞分泌，也属一种蛋白水解酶，特异地作用于胰蛋白酶原，从其氨基末端水解掉 1 分子的六肽，生成有活性的胰蛋白酶。然后胰蛋白酶又将糜蛋白酶原，弹性蛋白酶原和羧基肽酶原激活。胰蛋白酶的自身激活作用较弱（图 7-2）。由于胰液中各种蛋白酶均以酶原的形式存在，同时胰液中又存在胰蛋白酶抑制剂，这样能保护胰腺组织免受蛋白酶的自身消化。



● 图 7-2　胰液中各种蛋白水解酶的激活过程

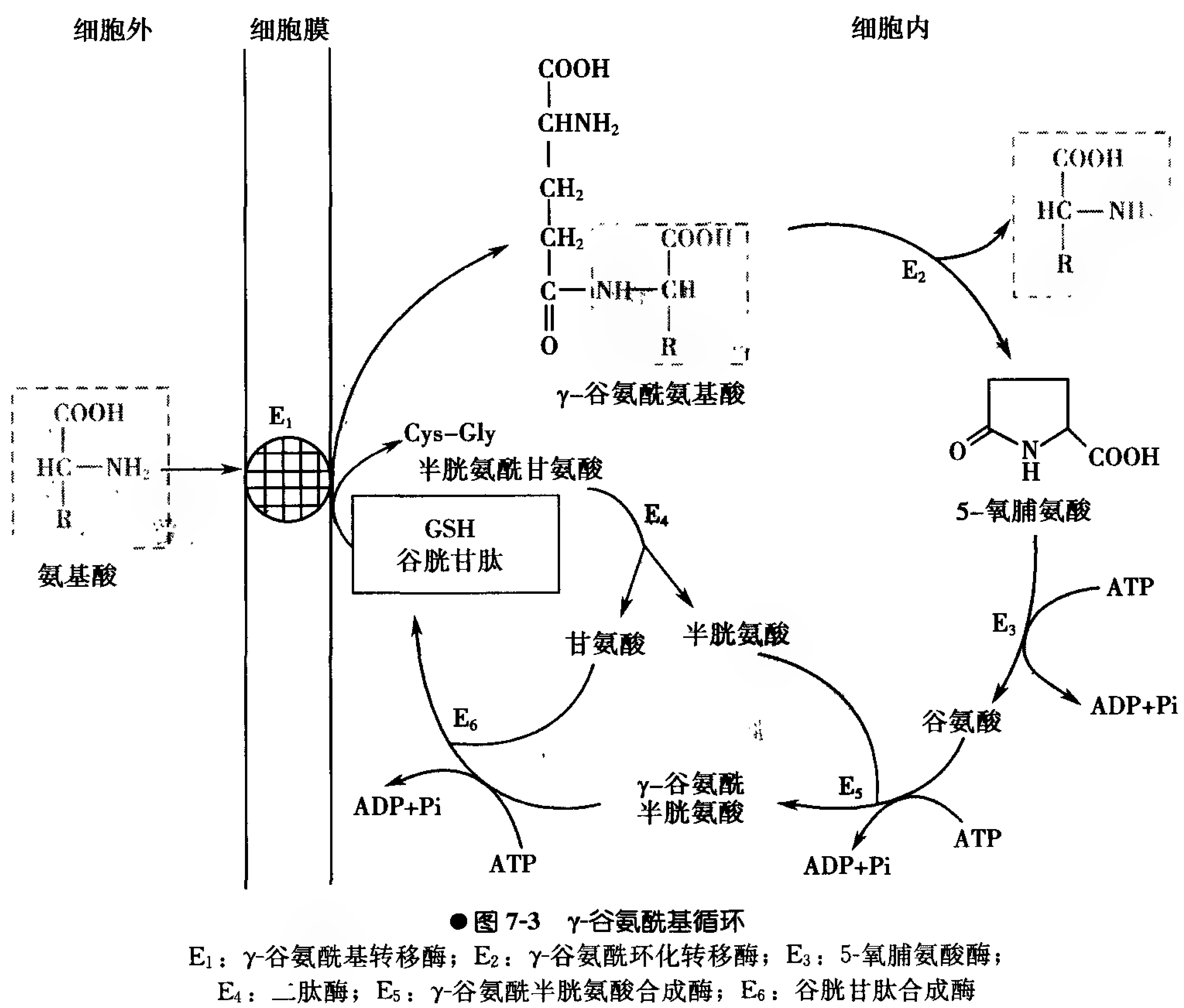
蛋白质经胃液和胰液中蛋白酶的消化，产物中仅有 1/3 为氨基酸，其余 2/3 为寡肽。寡肽的水解主要在小肠黏膜细胞内进行。小肠黏膜细胞存在两种寡肽酶（oligopeptidase）：氨基肽酶（aminopeptidase）和二肽酶（dipeptidase）。氨基肽酶从氨基末端逐个水解出氨

基酸，最后生成二肽，二肽再经二肽酶水解，最终生成氨基酸。

（二）氨基酸通过主动转运过程被吸收

氨基酸的吸收主要在小肠进行。肠黏膜细胞膜上存在转运氨基酸的载体蛋白（carrier protein），能与氨基酸和 Na^+ 形成三联体，将氨基酸和 Na^+ 转运入细胞，Na^+ 则借钠泵排出细胞外，并消耗 ATP。由于氨基酸结构的差异，转运氨基酸的载体蛋白也不相同。已知体内至少有 7 种转运蛋白（transporter），参与氨基酸和小肽的吸收。这些转运蛋白包括中性氨基酸转运蛋白、酸性氨基酸转运蛋白、碱性氨基酸转运蛋白、亚氨基酸转运蛋白、β-氨基酸转运蛋白、二肽转运蛋白及三肽转运蛋白。当某些氨基酸共用同一载体时，由于这些氨基酸在结构上有一定的相似性，它们在吸收过程中将彼此竞争。氨基酸通过转运蛋白的吸收过程不仅存在于小肠黏膜细胞，也存在于肾小管细胞和肌细胞等细胞膜上。

除了上述氨基酸的吸收机制外，小肠黏膜细胞、肾小管细胞和脑组织吸收氨基酸还可通过 γ-谷氨酰基循环（γ-glutamyl cycle）进行。此循环由 Meister 提出，故又称 Meister 循环。其反应过程是首先由谷胱甘肽对氨基酸进行转运，然后再进行谷胱甘肽的合成，由此构成一个循环（图 7-3）。



● 图 7-3　γ-谷氨酰基循环

E_1：γ-谷氨酰基转移酶；E_2：γ-谷氨酰环化转移酶；E_3：5-氧脯氨酸酶；
E_4：二肽酶；E_5：γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶；E_6：谷胱甘肽合成酶

催化上述反应的各种酶，除 γ-谷氨酰基转移酶（γ-glutamyl transferase）位于细胞膜外，其余的酶均存在于胞液中。在这些酶中，γ-谷氨酰基转移酶是关键酶。

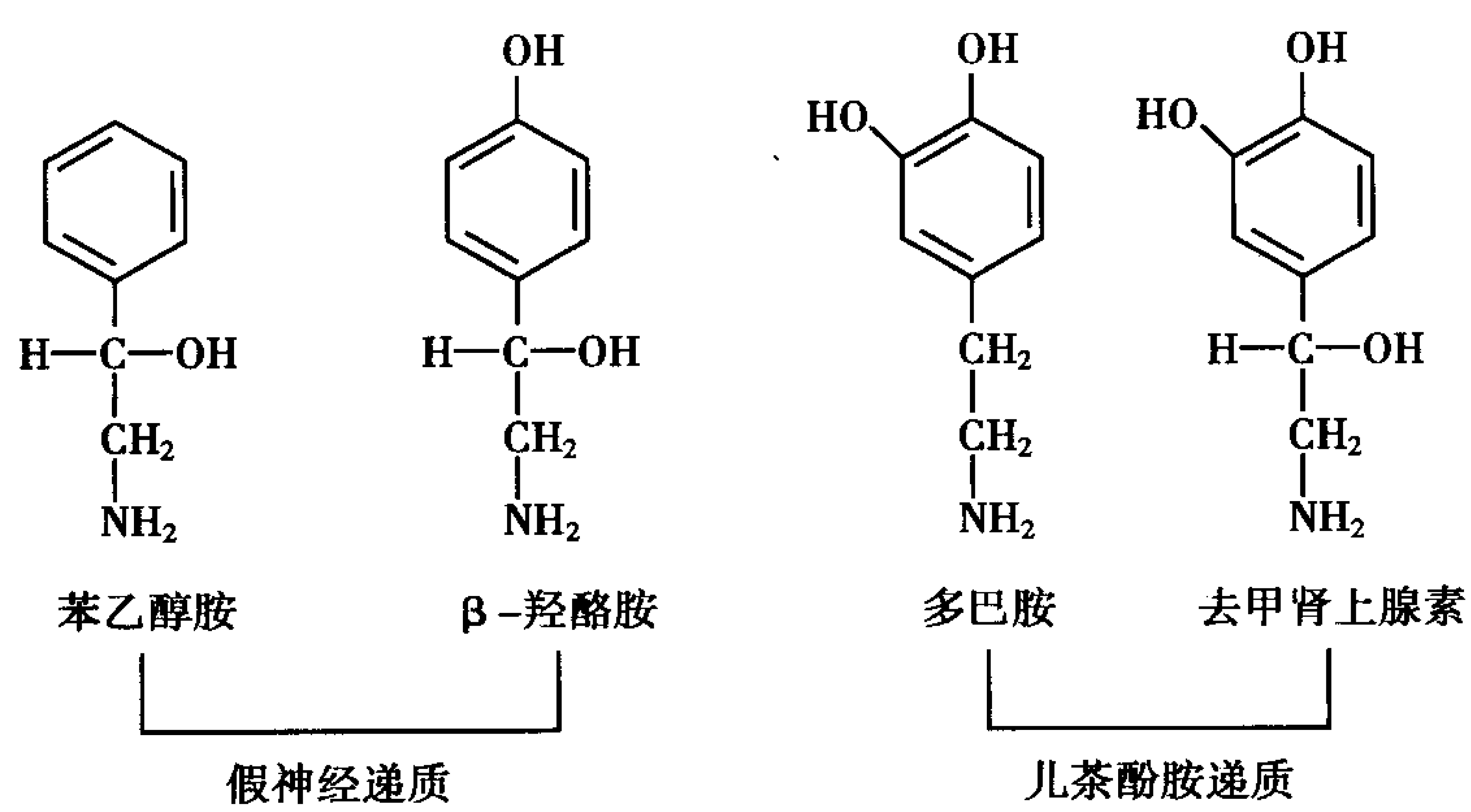
肠黏膜细胞上还存在着吸收二肽或三肽的转运体系。此种转运也是一个耗能的主动吸收过程。吸收作用在小肠近端较强，故肽吸收入细胞甚至先于游离氨基酸。不同二肽的吸收具有相互竞争作用。

二、蛋白质在肠道发生腐败作用

食物中的蛋白质，大约95%被消化吸收。未被消化的蛋白质及未被吸收的氨基酸，在大肠下部会受大肠杆菌的分解，此分解作用称为腐败作用（putrefaction）。实际上，腐败作用是肠道细菌本身的代谢过程，以无氧分解为主。腐败作用的产物，有些对人体具有一定的营养作用，例如维生素及脂肪酸等，而大多数产物对人体是有害的，例如胺类(amine)、氨（ammonia）、酚类（phenol）、吲哚（indole）及硫化氢等。

(一) 肠道细菌通过脱羧基作用产生胺类

未被消化的蛋白质经肠道细菌蛋白酶的作用水解生成氨基酸，氨基酸在细菌氨基酸脱羧酶的作用下，脱去羧基生成有毒的胺类。例如组氨酸、赖氨酸、色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸通过脱羧基作用分别生成组胺、尸胺、色胺、酪胺及苯乙胺。这些腐败产物大多有毒性，例如组胺和尸胺具有降低血压的作用，酪胺具有升高血压的作用。这些有毒物质通常经肝代谢转化为无毒形式排出体外。酪胺和苯乙胺若不能在肝内及时转化，易进入脑组织，分别经β羟化酶作用，转化为β-多巴胺（羟酪胺）和苯乙醇胺，其结构类似于儿茶酚胺，故称为假神经递质（false neurotransmitter)。假神经递质增多时，可竞争性地干扰儿茶酚胺，阻碍神经冲动传递，使大脑发生异常抑制，这可能是肝性脑病发生的原因之一。



(二) 肠道细菌通过脱氨基或尿素酶的作用产生氨

未被吸收的氨基酸在肠道细菌的作用下，通过脱氨基作用生成氨，这是肠道氨的重要来源之一。另一来源是血液中的尿素渗入肠道，经肠菌尿素酶的水解而生成氨。这些氨均可被吸收进入血液，在肝中合成尿素。降低肠道的pH，可减少氨的吸收。

(三) 腐败作用产生其他有害物质

除了胺类和氨以外，通过腐败作用还可产生其他有害物质，例如苯酚、吲哚、甲基吲哚及硫化氢等。

正常情况下，上述有害物质大部分随粪便排出，只有小部分被吸收，经肝的代谢转变而解毒，故不会发生中毒现象。

第三节　氨基酸的一般代谢

一、体内蛋白质分解生成氨基酸

体内的蛋白质处于不断合成与降解的动态平衡。成人体内的蛋白质每天有1%～2%被

降解，其中主要是肌肉蛋白质。蛋白质降解所产生的氨基酸，大约70%～80%又被重新利用合成新的蛋白质。

（一）蛋白质以不同的速率进行降解

不同的蛋白质降解速率不同。蛋白质的降解速率随生理需要而变化，若以高的平均速率降解，标志此组织正在进行主要结构的重建，例如妊娠中的子宫组织或严重饥饿造成的骨骼肌蛋白质的降解。蛋白质降解的速率用半寿期（half-life，$t_{1/2}$）表示，半寿期是指将其浓度减少到开始值的50%所需要的时间。肝中蛋白质的$t_{1/2}$短的低于30分钟，长的超过150小时，但肝中大部分蛋白质的$t_{1/2}$为1～8天。人血浆蛋白质的$t_{1/2}$约为10天，结缔组织中的一些蛋白质的$t_{1/2}$可达180天以上，眼晶体蛋白质的$t_{1/2}$更长。体内许多关键酶的$t_{1/2}$都很短，例如胆固醇合成的关键酶HMG-CoA还原酶的$t_{1/2}$为0.5～2小时。为了满足生理需要，关键酶的降解既可加速亦可滞后，从而改变酶的含量，进一步改变代谢产物的流量和浓度。

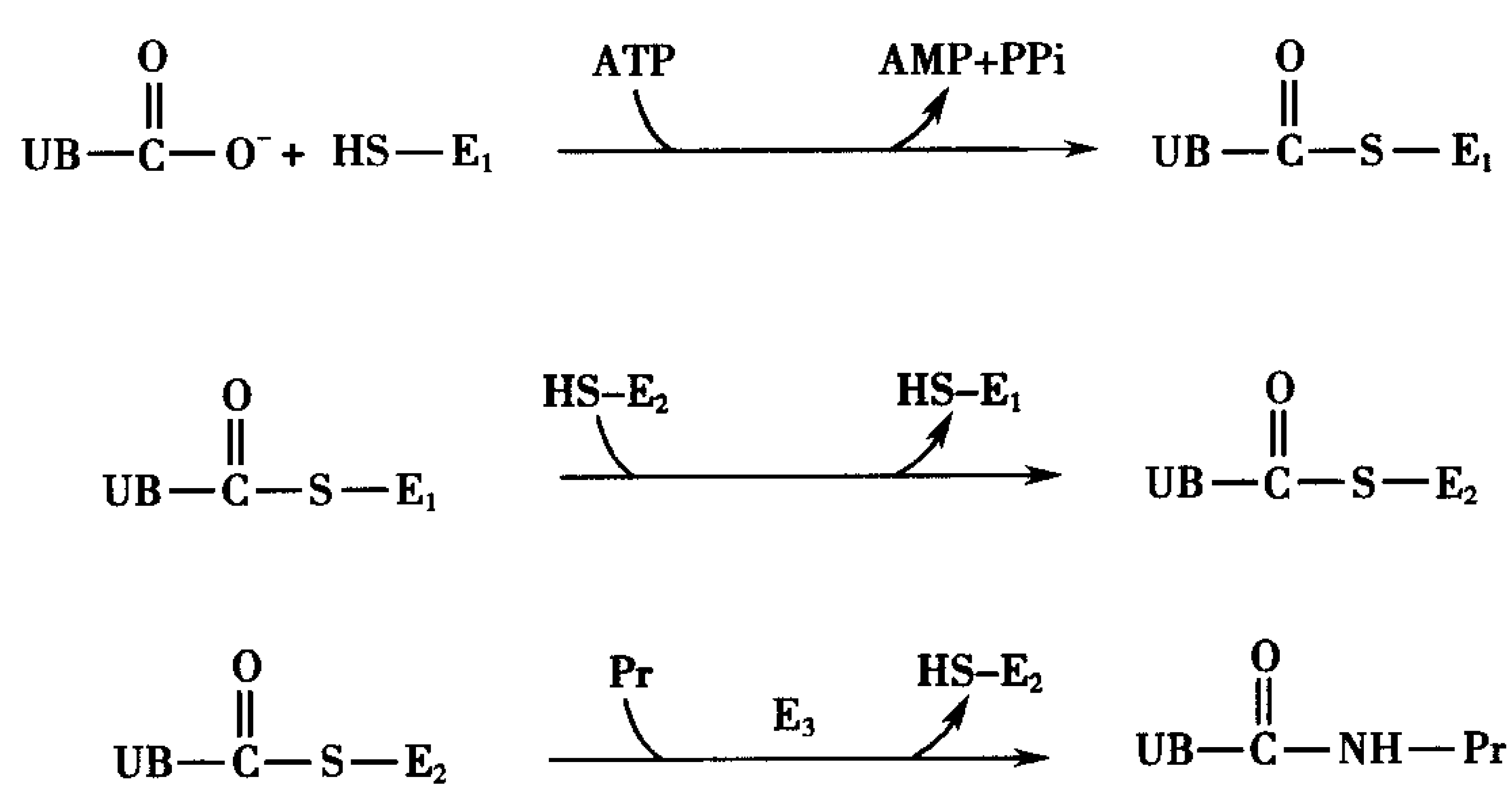
（二）真核细胞内蛋白质的降解有两条重要途径

细胞内蛋白质的降解也是通过一系列蛋白酶和肽酶完成的。蛋白质被蛋白酶水解成肽，然后肽被肽酶降解成游离氨基酸。

1. 蛋白质在溶酶体通过ATP-非依赖途径被降解　溶酶体的主要功能是消化作用，是细胞内的消化器官。溶酶体含有多种蛋白酶，称为组织蛋白酶（cathepsin）。这些蛋白酶对所降解的蛋白质选择性较差，主要降解细胞外来的蛋白质、膜蛋白和胞内长寿蛋白质。蛋白质通过此途径降解，不需要消耗ATP。

2. 蛋白质在蛋白酶体通过ATP-依赖途径被降解　蛋白质通过此途径降解需泛素的参与。泛素是一种由76个氨基酸组成的多肽，因其广泛存在于真核细胞而得名。泛素介导的蛋白质降解过程是一个复杂的过程。首先由泛素与被选择降解的蛋白质形成共价连接，使其标记并被激活，然后蛋白酶体（proteasome）特异性地识别泛素标记的蛋白质并将其降解，泛素的这种标记作用称为泛素化（ubiquitination）。泛素化包括三种酶参与的3步反应，并需消耗ATP（图7-4）。一种蛋白质的降解需多次泛素化反应，形成泛素链（ubiquitin chain）。其后，泛素化的蛋白质在蛋白酶体降解，产生一些约7～9个氨基酸残基组成的肽链，肽链进一步水解生成氨基酸。

蛋白酶体存在于细胞核和胞质内，主要降解异常蛋白质和短寿蛋白质。蛋白酶体是一个26S的蛋白质复合物，由20S的核心颗粒（core particle，CP）和19S的调节颗粒（regulatory particle，RP）组成。CP是由2个α环和2个β环组成的圆柱体，2个α环分别位于圆柱体的上下两端，而2个β环则夹在2个α环之间。每个α环由7个α亚基组成，



● 图7-4　蛋白质降解的泛素化反应

UB：泛素；E_1：泛素激活酶；E_2：泛素结合酶

E_3：泛素蛋白连接酶；Pr：被降解蛋白质

而β环由7个β亚基组成，CP中心形成空腔。CP是蛋白酶体的水解核心，活性位点位于2个β环上，β环7个β亚基中有3个亚基具有蛋白酶活性，可催化不同的蛋白质降解。2个19S的RP分别位于柱形核心颗粒的两端，形成空心圆柱的盖子，由18个亚基组成，其中某些亚基识别、结合待降解的泛素化蛋白，6个亚基具有ATP酶活性，与蛋白质的去折叠以及使蛋白质定位于CP有关。

A. Ciechanover等对体内蛋白质降解研究的贡献

以色列科学家A. Ciechanover、A Hershko和美国科学家I. Rose因发现泛素调节的蛋白质降解被授予2004年诺贝尔化学奖。这一工作是在20世纪70年代到80年代完成的。在这期间，他们联名发表了一系列论文，揭示了泛素介导的蛋白质降解机制，从而指明了蛋白质降解研究的方向。

1978年，A. Ciechanover和A. Hershko从网织红细胞裂解液中分离出两种组分APF-Ⅰ（active principle fraction Ⅰ）和APF-Ⅱ，每一组分单独存在时都不具有活性，然而一旦将这两种组分混合，就会引发ATP依赖的蛋白质降解。1980年A. Ciechanover，A. Hershko和I. Rose发表文章指出，APF-Ⅰ可以以共价键形式与提取物中的许多蛋白质牢固结合，而且一个靶蛋白能结合多个APF-Ⅰ分子，随后证明APF-Ⅰ与泛素是同一物质。APF-Ⅱ可分成两个亚类即APF-$Ⅱ_a$和APF-$Ⅱ_b$，APF-$Ⅱ_a$的主要成分是原来被命名的蛋白酶体，而APF-$Ⅱ_b$含有催化泛素标记底物蛋白的三种酶，即泛素激活酶、泛素结合酶和泛素蛋白连接酶。

泛素控制的蛋白质降解具有重要的生理意义，它不仅能够清除错误的蛋白质，而且对细胞生长周期、DNA复制及染色体结构都有重要的调控作用。

二、外源性氨基酸与内源性氨基酸组成氨基酸代谢库

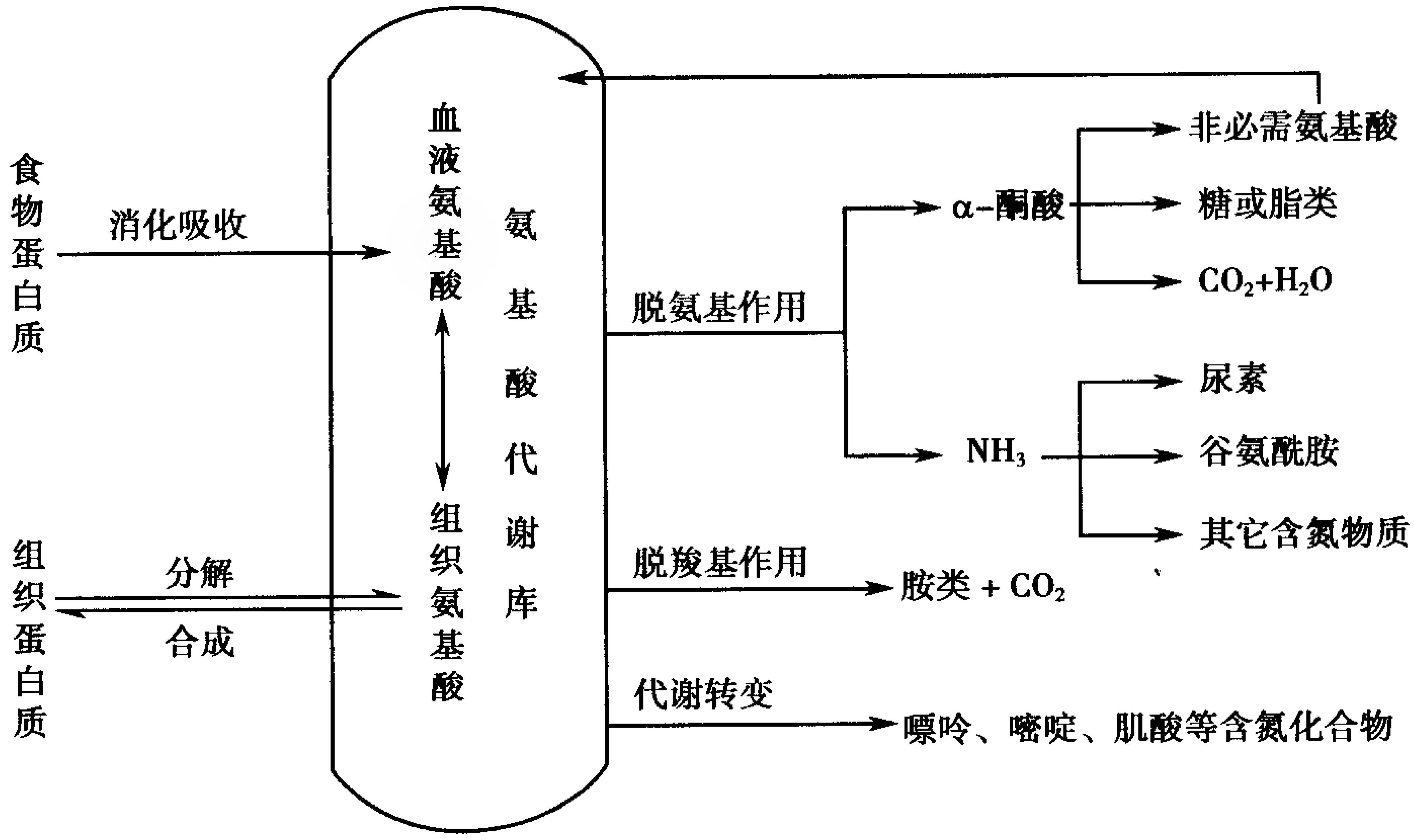
食物蛋白质经消化而被吸收的氨基酸（外源性氨基酸）与体内组织蛋白质降解产生的氨基酸及体内合成的非必需氨基酸（内源性氨基酸）混在一起，分布于体内各处，参与代谢，称为氨基酸代谢库（metabolic pool）。氨基酸代谢库通常以游离氨基酸总量计算。由于氨基酸不能自由通过细胞膜，所以在体内的分布是不均一的。肌肉中的氨基酸占总代谢库的50%以上。肝约占10%，肾约占4%，血浆占1%～6%。消化吸收的大多数氨基酸，例如丙氨酸和芳香族氨基酸等主要在肝中分解，而支链氨酸的分解代谢主要在骨骼肌中进行。

体内氨基酸的主要功能是合成蛋白质和多肽，也可转变成其他含氮化合物。正常人尿中排出的氨基酸极少。由于各种氨基酸具有共同的结构特点，因此它们的代谢途径有共同之处，但不同的氨基酸由于结构的差异，代谢方式也有不同之处。体内氨基酸代谢的概况见图7-5。

三、联合脱氨基作用是体内主要的脱氨基途径

（一）氨基酸通过转氨基作用脱去氨基

1. 转氨基作用由转氨酶催化完成 转氨基作用（transamination）是在转氨酶（trans-



●图 7-5　体内氨基酸的代谢概况

aminase）的催化下，可逆地把 α-氨基酸的氨基转移给 α-酮酸，结果是氨基酸脱去氨基生成相应的 α 酮酸，而原来的 α-酮酸则转变成另一种氨基酸。



转氨酶也称氨基转移酶（aminotransferase），广泛分布于体内各组织中，其中以肝及心肌含量最丰富。转氨基作用的平衡常数接近 1.0，反应是完全可逆的。因此，转氨基作用既是氨基酸的分解代谢过程，也是体内某些氨基酸合成的重要途径。除赖氨酸、苏氨酸、脯氨酸及羟脯氨酸外，大多数氨基酸都能进行转氨基作用。除了 α-氨基外，氨基酸侧链末端的氨基，如鸟氨酸的 δ-氨基也可通过转氨基作用脱去氨基。

体内存在着多种转氨酶，不同氨基酸与 α-酮酸之间的转氨基作用只能由专一的转氨酶催化。在各种转氨酶中，以 L-谷氨酸和 α-酮酸的转氨酶最为重要。例如谷丙转氨酶（glutamic pyruvic transaminase，GPT）又称丙氨酸转氨酶（alanine transaminase，ALT）和谷草转氨酶（glutamic oxaloacetic transaminase，GOT）又称天冬氨酸转氨酶（aspartate transaminase，AST）在体内广泛存在，但各组织中的含量不同（表 7-1）。

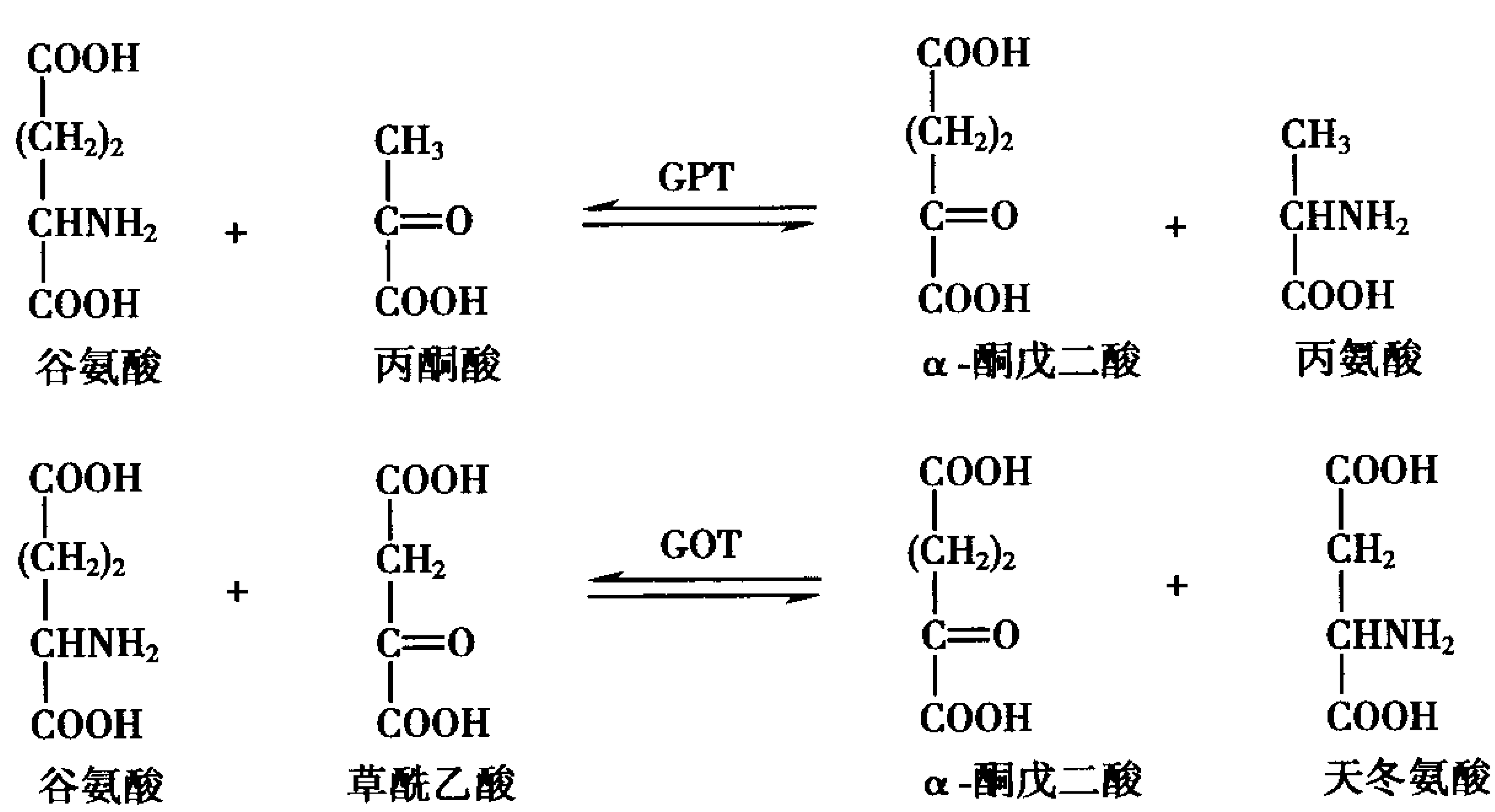
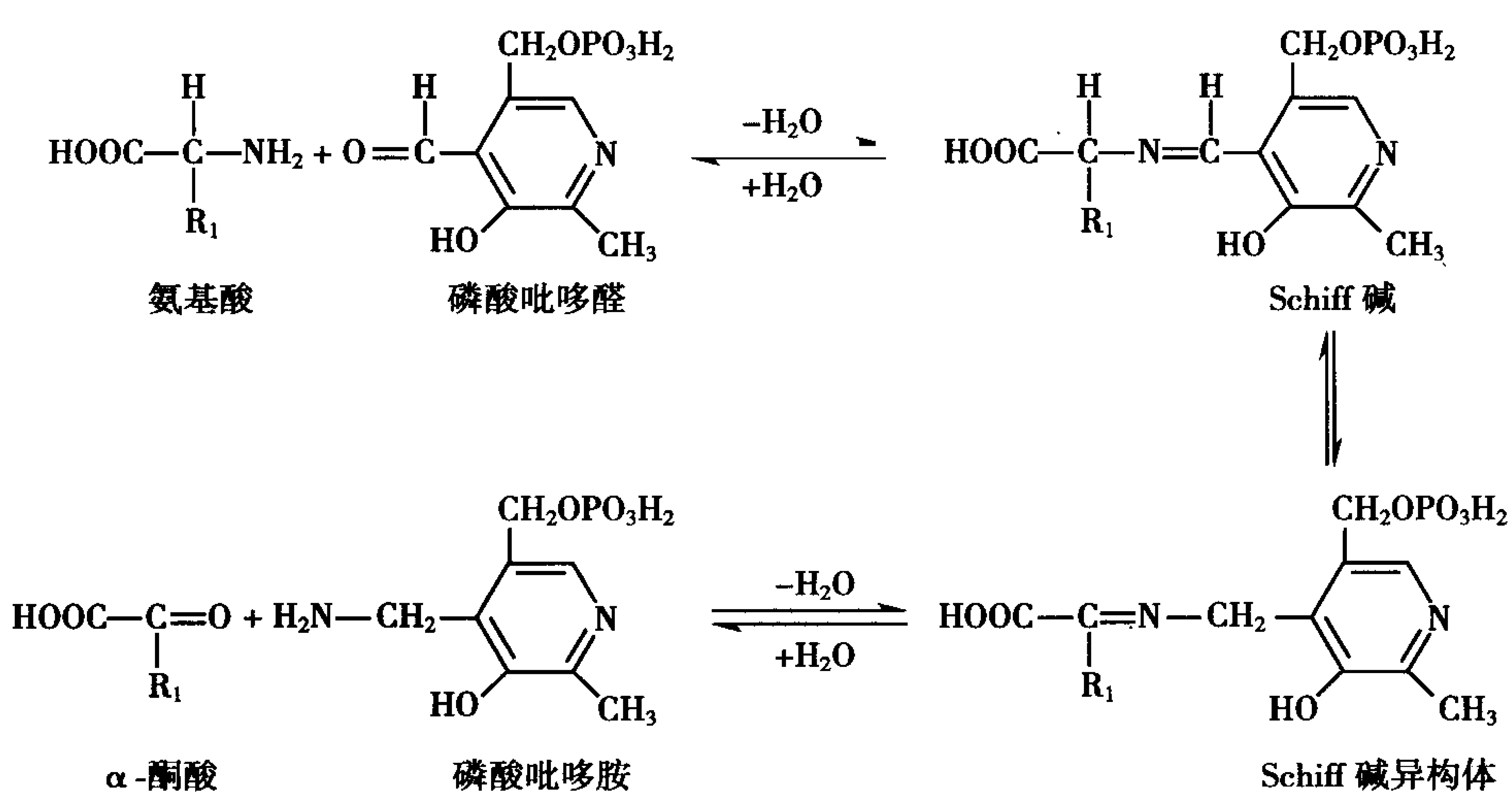


表 7-1 正常人各组织中 GPT 及 GOT 活性（单位/克湿组织）

组织	GPT	GOT	组织	GPT	GOT
肝	44000	142000	胰腺	2000	28000
肾	19000	91000	脾	1200	14000
心	7100	156000	肺	700	10000
骨骼肌	4800	99000	血清	16	20

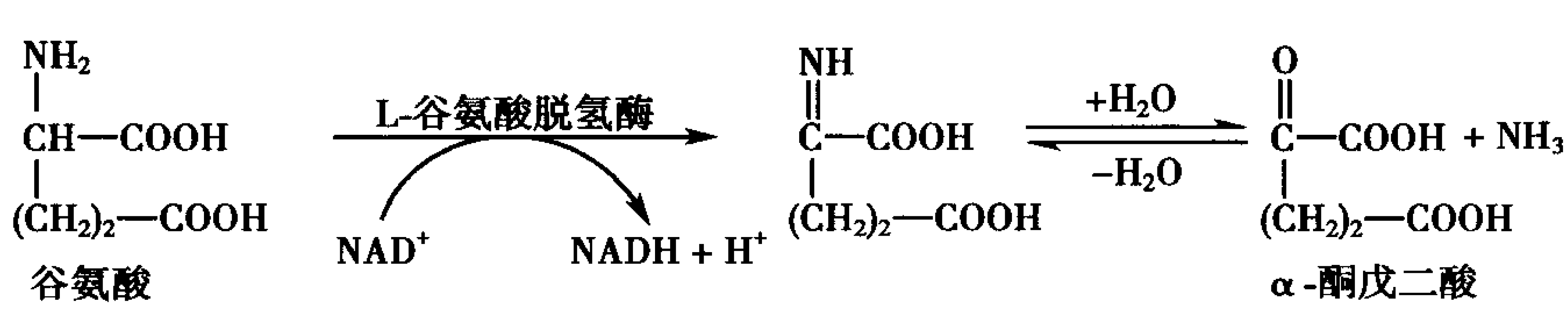
正常时，转氨酶主要存在于细胞内，血清中的活性很低。肝组织中 GPT 的活性最高，心肌组织中 GOT 的活性最高。当某种原因使细胞膜通透性增高或细胞破坏时，转氨酶可大量释放入血，使血清中转氨酶活性明显升高。例如急性肝炎患者血清 GPT 活性显著升高；心肌梗死患者血清 GOT 明显上升。临床上可以此作为疾病诊断和预后的参考指标之一。

2. 各种转氨酶都具有相同的辅酶和作用机制 转氨酶的辅酶都是维生素 B_6 的磷酸酯，即磷酸吡哆醛（pyridoxal phosphate），它结合于转氨酶活性中心赖氨酸的 ε-氨基上。在反应过程中，磷酸吡哆醛先从氨基酸接受氨基转变成磷酸吡哆胺，而氨基酸则转变成 α-酮酸，磷酸吡哆胺进一步将氨基转移给另一种 α-酮酸而生成相应的氨基酸，同时磷酸吡哆胺又转变为磷酸吡哆醛。在转氨酶的催化下，磷酸吡哆醛与磷酸吡哆胺的这种相互转变，起着传递氨基的作用，下式说明反应过程。



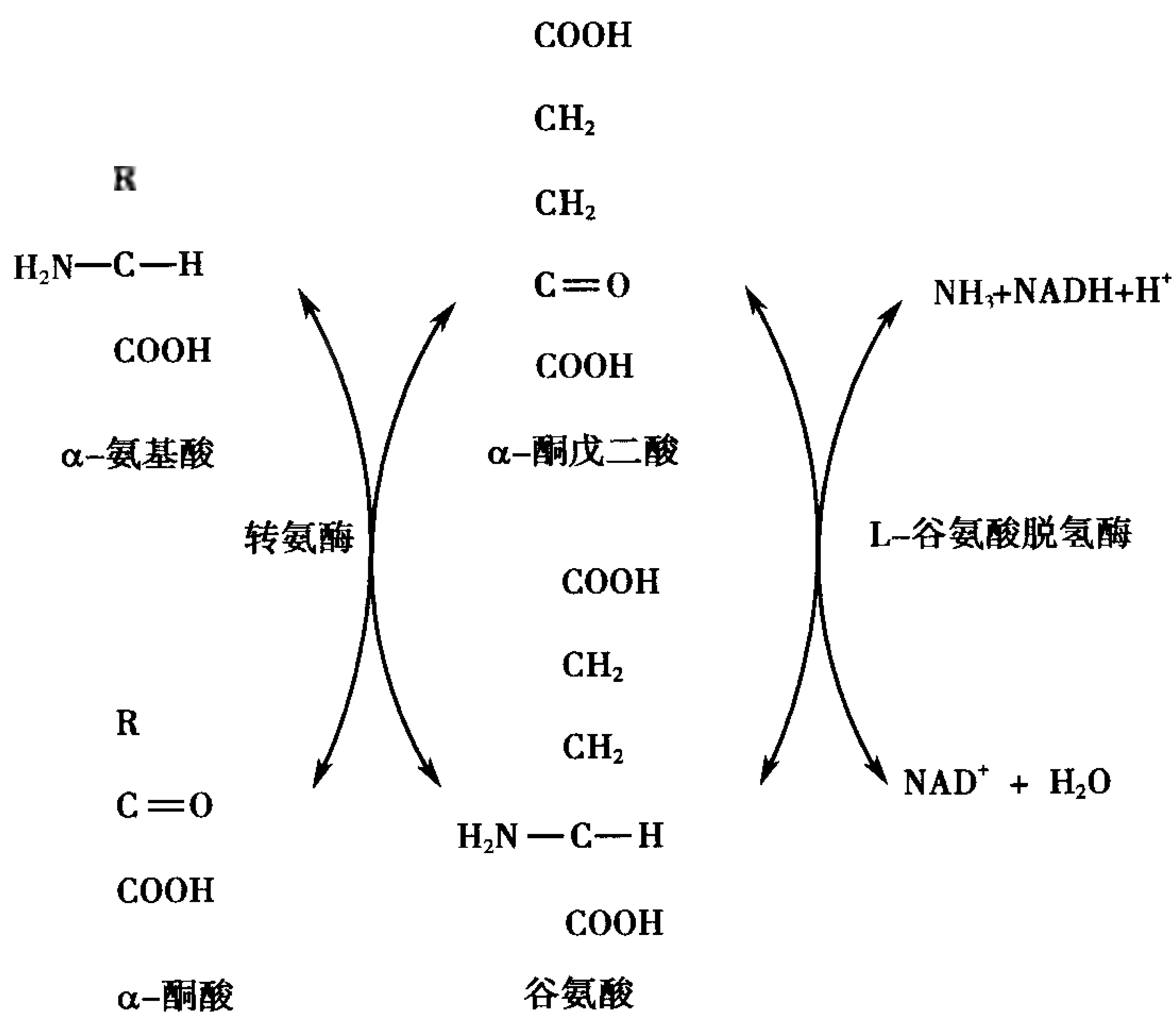
（二）*L*-谷氨酸通过 *L*-谷氨酸脱氢酶催化脱去氨基

转氨基作用使许多氨基酸的氨基被聚集在 α-酮戊二酸上生成 *L*-谷氨酸。*L*-谷氨酸是哺乳动物组织中唯一能以相当高的速率进行氧化脱氨反应的氨基酸，脱下的氨基进一步代谢后排出体外。*L*-谷氨酸的氧化脱氨反应由 *L*-谷氨酸脱氢酶（*L*-glutamate dehydrogenase）催化完成，此酶广泛存在于肝、肾和脑等组织中，属一种不需氧脱氢酶。在 *L*-谷氨酸脱氢酶的催化下，*L*-谷氨酸氧化脱氨生成 α-酮戊二酸和氨。*L*-谷氨酸脱氢酶是唯一既能利用 NAD^+ 又能利用 $NADP^+$ 接受还原当量的酶。



L-谷氨酸脱氢酶是一种变构酶，由 6 个相同的亚基聚合而成，每个亚基的分子量为 56000。ATP 与 GTP 是此酶的变构抑制剂，而 ADP 和 GDP 是变构激活剂。因此，当体内的能量不足时能加速氨基酸的氧化，对机体的能量代谢起重要的调节作用。

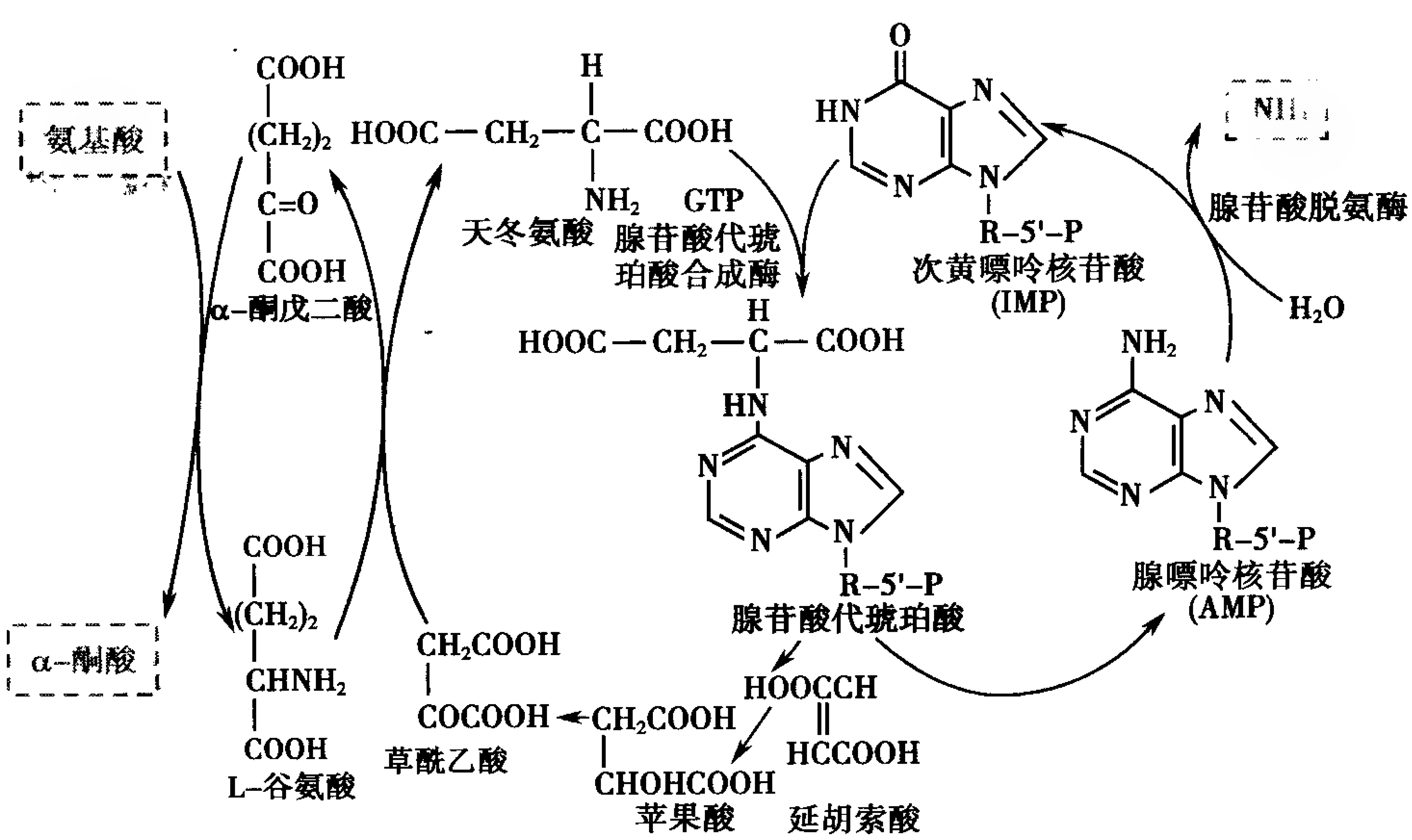
转氨基作用只是把氨基酸分子中的氨基转移给 α-酮戊二酸或其他 α-酮酸，并没有达到脱氨基的目的。若转氨酶与 *L*-谷氨酸脱氢酶协同作用，即转氨基作用与谷氨酸的氧化脱氨基作用偶联进行，就可达到把氨基酸转变成 NH_3 及相应 α-酮酸的目的。转氨基作用与谷氨酸脱氢作用的结合被称作转氨脱氨作用（transdeamination），又称联合脱氨基作用（图 7-6）。



●图 7-6 联合脱氨基作用

（三）氨基酸通过嘌呤核苷酸循环脱去氨基

心肌和骨骼肌中 *L*-谷氨酸脱氢酶的活性很弱，氨基酸很难通过联合脱氨基作用脱去氨

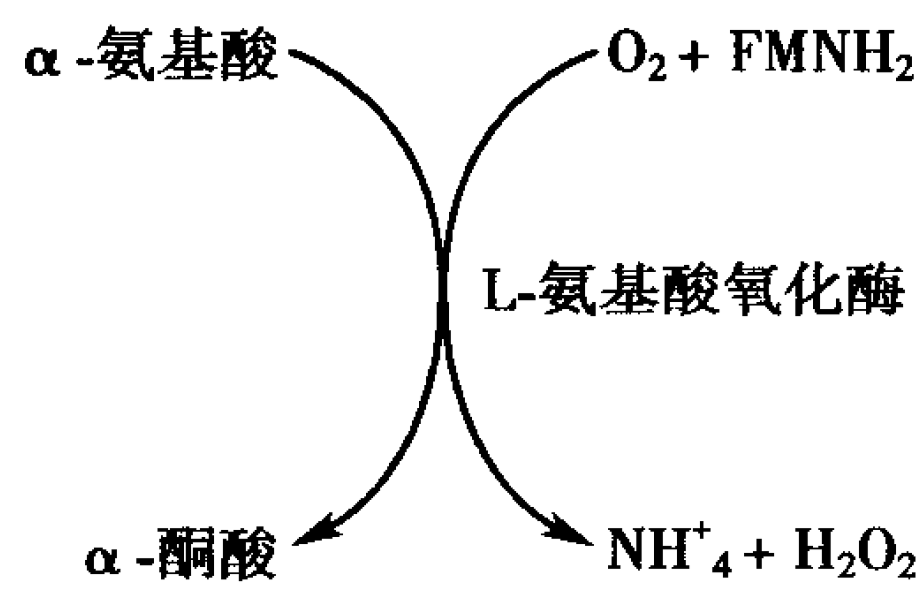


●图 7-7 嘌呤核苷酸循环

基。在这些组织中，氨基酸主要通过嘌呤核苷酸循环（purine nucleotide cycle）脱去氨基。在此过程中，氨基酸首先通过连续的转氨基作用将氨基转移给草酰乙酸，生成天冬氨酸。天冬氨酸与次黄嘌呤核苷酸（IMP）反应生成腺苷酸代琥珀酸，后者经裂解释放延胡索酸并生成腺嘌呤核苷酸（AMP）。AMP 在腺苷酸脱氨酶的催化下脱去氨基，最终完成氨基酸的脱氨基作用。IMP 可以再参加循环（图 7-7）。由此可见，嘌呤核苷酸循环也可看成是另一种形式的联合脱氨基作用。

（四）氨基酸通过氨基酸氧化酶催化脱去氨基

大多数从 *L*-α-氨基酸中释放的氨反映了转氨酶和 *L*-谷氨酸脱氢酶的联合作用。在肝肾组织中还存在一种 *L*-氨基酸氧化酶，属黄酶类，其辅基是 FMN 或 FAD。这些能够自动氧化的黄素蛋白将氨基酸氧化成 α-亚氨基酸，接着再加水分解成相应的 α-酮酸，并释放铵离子，分子氧再直接氧化还原型的黄素蛋白形成过氧化氢（H_2O_2），H_2O_2 被过氧化氢酶裂解成氧和 H_2O。过氧化氢酶存在于大多数组织中，尤其是肝。



四、氨基酸碳链骨架可进行转换或分解

氨基酸脱氨基后生成的 α-酮酸（α-keto acid）可以进一步代谢，主要有以下三方面的代谢途径。

（一）α-酮酸可彻底氧化分解并提供能量

α-酮酸在体内可通过三羧酸循环与生物氧化体系彻底氧化生成 CO_2 和 H_2O，同时释放能量以供机体生理活动需要。可见，氨基酸也是一类能源物质。

（二）α-酮酸经氨基化生成营养非必需氨基酸

体内的一些营养非必需氨基酸可通过相应的 α-酮酸经氨基化而生成。这些 α-酮酸也可来自糖代谢和三羧酸循环的产物。例如，丙酮酸、草酰乙酸、α-酮戊二酸分别转变成丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。

（三）α-酮酸可转变成糖和脂类化合物

在体内 α-酮酸可以转变成糖和脂类化合物。实验发现，分别用不同氨基酸饲养人工造成糖尿病的犬时，大多数氨基酸可使尿中排出的葡萄糖增加，少数几种则可使葡萄糖及酮体的排出同时增加，而亮氨酸和赖氨酸只能使酮体的排出增加。由此，将在体内可以转变成糖的氨基酸称为生糖氨基酸（glucogenic amino acid）；能转变成酮体的氨基酸称为生酮氨基酸（ketogenic amino acid）；既能转变成糖又能转变成酮体的氨基酸称为生糖兼生酮氨基酸（glucogenic and ketogenic amino acid）（表 7-2）。

用同位素标记氨基酸的实验证明，上述营养学研究的结果是正确的。各种氨基酸脱氨基后产生的 α-酮酸结构差异很大，其代谢途径也不尽相同，转变过程中间产物包括乙酰 CoA（生酮氨基酸）和丙酮酸及三羧酸循环的中间物，例如 α-酮戊二酸、草酰乙酸、延胡索酸及琥珀酰 CoA 等（生糖氨基酸）。

表 7-2　氨基酸生糖及生酮性质的分类

类　别	氨　基　酸
生糖氨基酸	甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸、组氨酸、精氨酸、半胱氨酸、脯氨酸、丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺、甲硫氨酸
生酮氨基酸	亮氨酸、赖氨酸
生糖兼生酮氨基酸	异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、苏氨酸、色氨酸

综上所述，氨基酸的代谢与糖和脂肪的代谢密切相关。氨基酸可转变成糖与脂肪；糖也可以转变成脂肪和一些非必需氨基酸的碳架部分。由此可知，三羧酸循环是物质代谢的总枢纽，通过它可以使糖、脂肪酸及氨基酸完全氧化，也可使其彼此相互转变，构成一个完整的代谢体系。

第四节　氨 的 代 谢

体内代谢产生的氨及消化道吸收的氨进入血液，形成血氨。正常生理情况下，血氨水平在 47～65μmol/L。氨具有毒性，特别是脑组织对氨的作用尤为敏感。

一、体内有毒性的氨有三个重要来源

(一) 氨基酸脱氨基作用和胺类分解均可产生氨

氨基酸脱氨基作用产生的氨是体内氨的主要来源。胺类的分解也可以产生氨。其反应如下：

$$RCH_2NH_2 \xrightarrow[\text{胺氧化酶}]{} RCHO+NH_3$$

(二) 肠道细菌腐败作用产生氨

蛋白质和氨基酸在肠道细菌的作用下产生氨，肠道尿素经细菌尿素酶水解也产生氨。肠道产氨量较多，每天约 4g。肠道腐败作用增强时，氨的产生量增多。肠道内产生的氨主要在结肠吸收入血。NH_3 比 NH_4^+ 易于穿过细胞膜而被吸收。在碱性环境中，NH_4^+ 易转变成 NH_3。因此肠道偏碱时，氨的吸收增强。临床上对高血氨病人采用弱酸性透析液作结肠透析，而禁止用碱性的肥皂水灌肠，就是为了减少氨的吸收。

(三) 肾小管上皮细胞分泌的氨主要来自谷氨酰胺

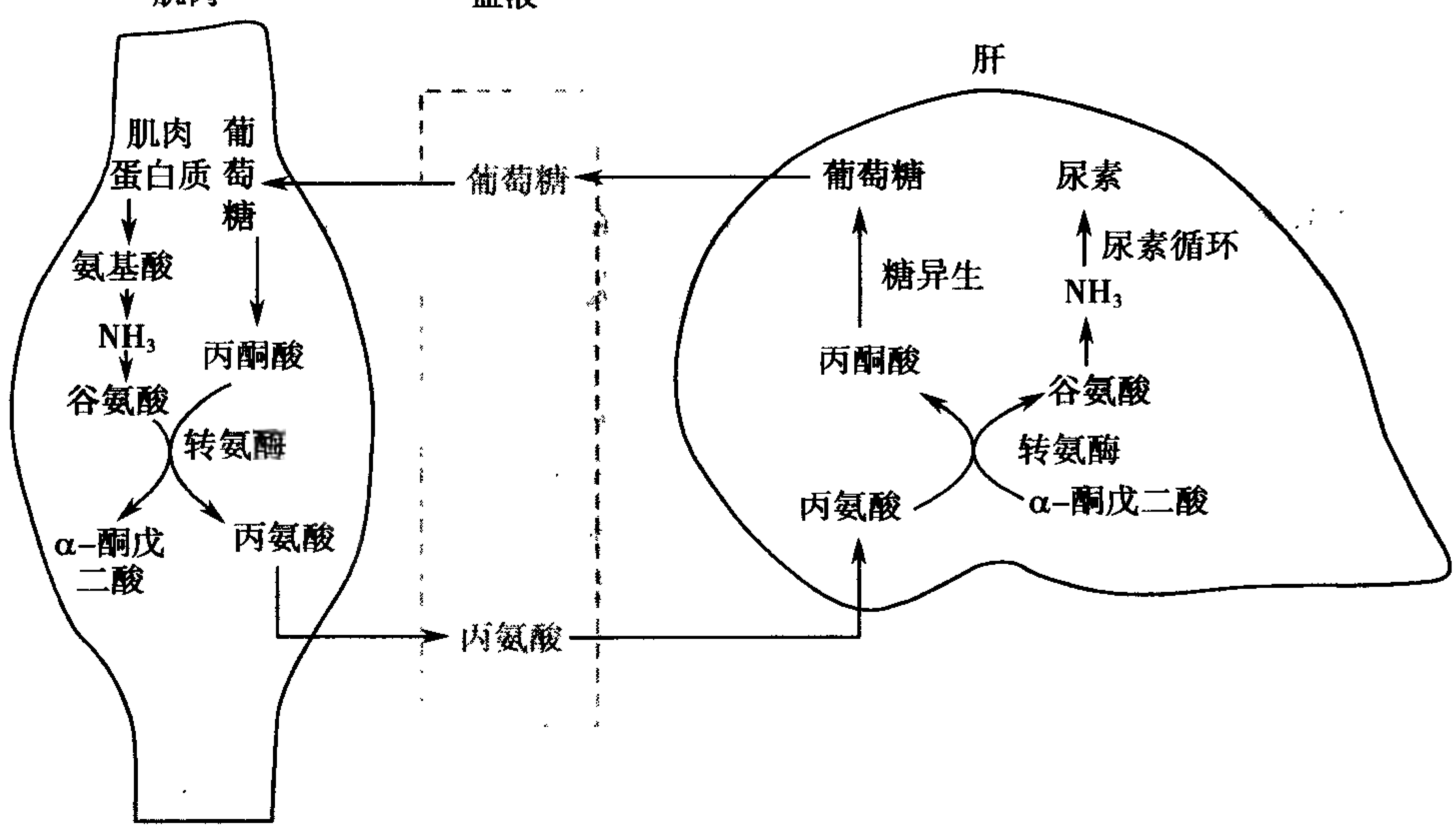
谷氨酰胺在谷氨酰胺酶的催化下水解成谷氨酸和氨，这部分氨分泌到肾小管管腔中与尿中的 H^+ 结合成 NH_4^+，以铵盐的形式由尿排出体外，这对调节机体的酸碱平衡起着重要作用。酸性尿有利于肾小管细胞中的氨扩散入尿，而碱性尿则妨碍肾小管细胞中 NH_3 的分泌，此时氨被吸收入血，成为血氨的另一个来源。由此，临床上对因肝硬化而产生腹水的病人，不宜使用碱性利尿药，以免血氨升高。

二、氨在血液中以丙氨酸和谷氨酰胺的形式转运

氨是有毒物质，各组织中产生的氨如何以无毒的方式经血液运输到肝合成尿素或运输到肾以铵盐的形式排出？现已知，氨在血液中主要是以丙氨酸及谷氨酰胺两种形式转运。

（一）通过丙氨酸-葡萄糖循环，氨从肌肉运往肝

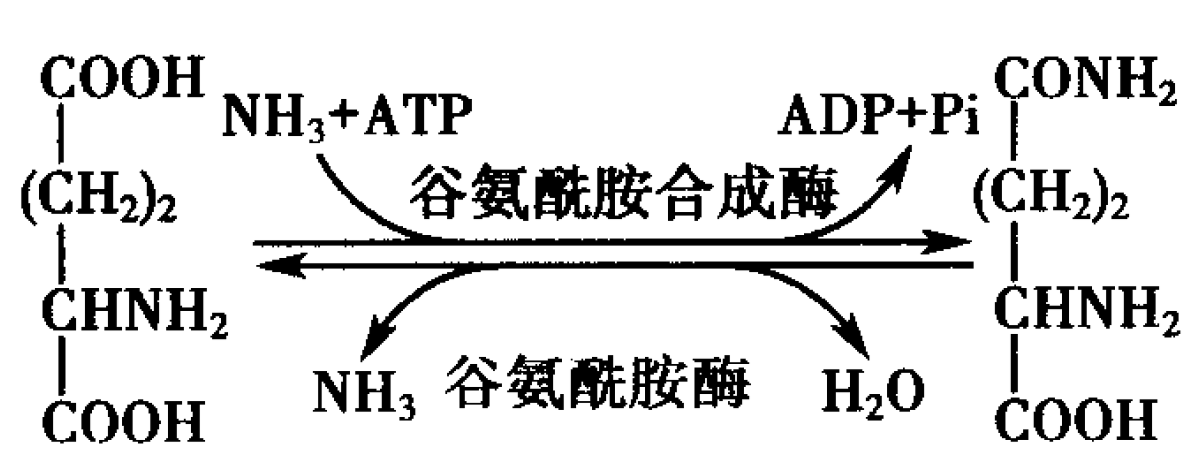
肌肉中的氨基酸经转氨基作用将氨基转给丙酮酸生成丙氨酸，丙氨酸经血液运往肝。在肝中，丙氨酸通过联合脱氨基作用，生成丙酮酸，并释放氨。氨用于合成尿素，丙酮酸经糖异生途径生成葡萄糖。葡萄糖由血液运往肌肉，沿糖降解途径转变成丙酮酸，后者再接受氨基生成丙氨酸。丙氨酸和葡萄糖周而复始的转变，完成肌肉和肝之间氨的转运，将这一途径称为丙氨酸-葡萄糖循环（alanine-glucose cycle）(图 7-8)。通过这个循环，肌肉中的氨以无毒的丙氨酸形式运往肝，同时，肝又为肌肉提供了生成丙酮酸的葡萄糖。



●图 7-8　丙氨酸-葡萄糖循环

（二）通过谷氨酰胺，氨从脑和肌肉等组织运往肝或肾

谷氨酰胺是另一种转运氨的形式，它主要从脑和肌肉等组织向肝或肾运氨。在脑和肌肉等组织，氨与谷氨酸在谷氨酰胺合成酶（glutamine synthetase）的催化下合成谷氨酰胺，并由血液运往肝或肾，再经谷氨酰胺酶（glutaminase）水解成谷氨酸及氨。谷氨酰胺的合成与分解是由不同酶催化的不可逆反应，其合成需消耗 ATP。

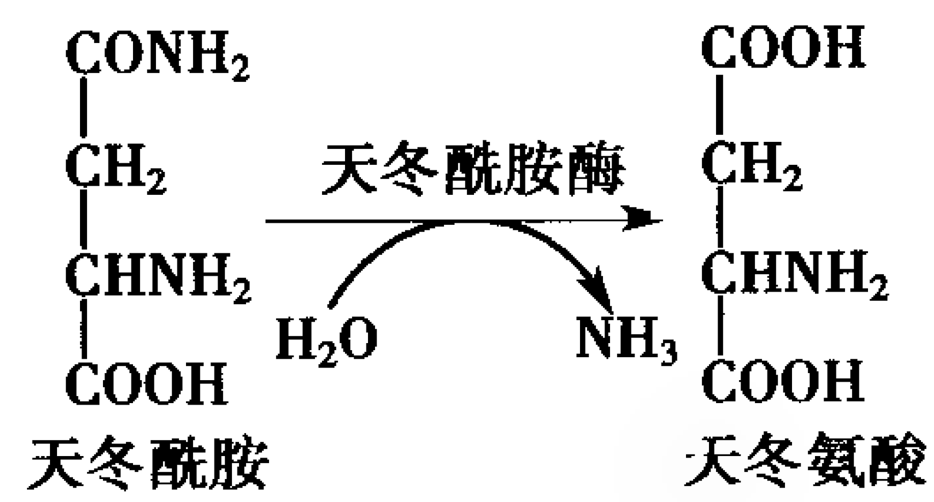


谷氨酰胺

L-谷氨酸

可以认为，谷氨酰胺既是氨的解毒产物，又是氨的储存及运输形式。谷氨酰胺在脑中固定和转运氨的过程中起着重要的作用。临床上对氨中毒的病人可服用或输入谷氨酸盐，以降低氨的浓度。

谷氨酰胺还可以提供酰胺基使天冬氨酸转变成天冬酰胺。正常细胞能合成足量的天冬酰胺供蛋白质的合成需要。但白血病细胞却不能或很少能合成天冬酰胺，必须依靠血液从其他器官运输而来。因此临床上应用天冬酰胺酶（asparaginase）使天冬酰胺水解成天冬氨酸，从而减少血中天冬酰胺，达到治疗白血病的目的。

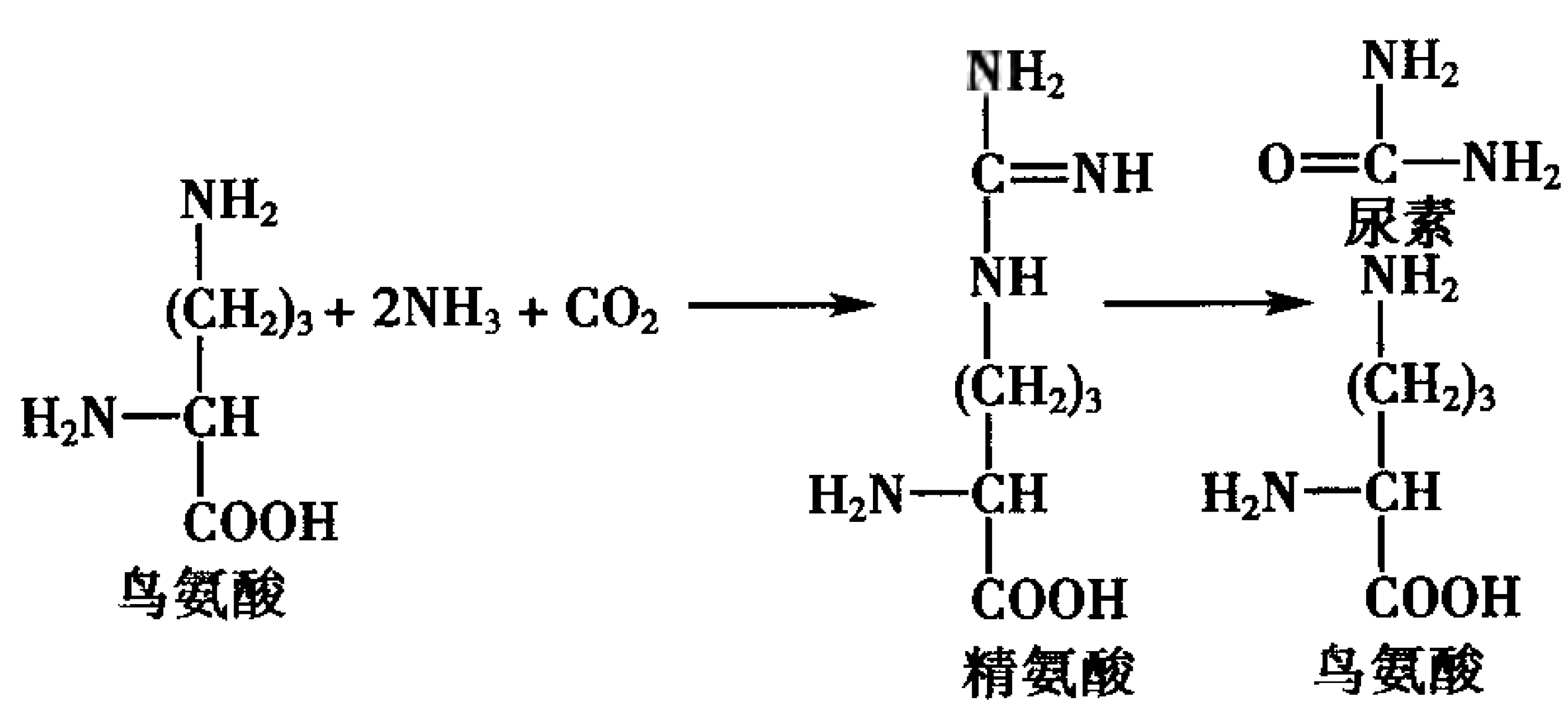


三、氨在肝合成尿素是氨的主要去路

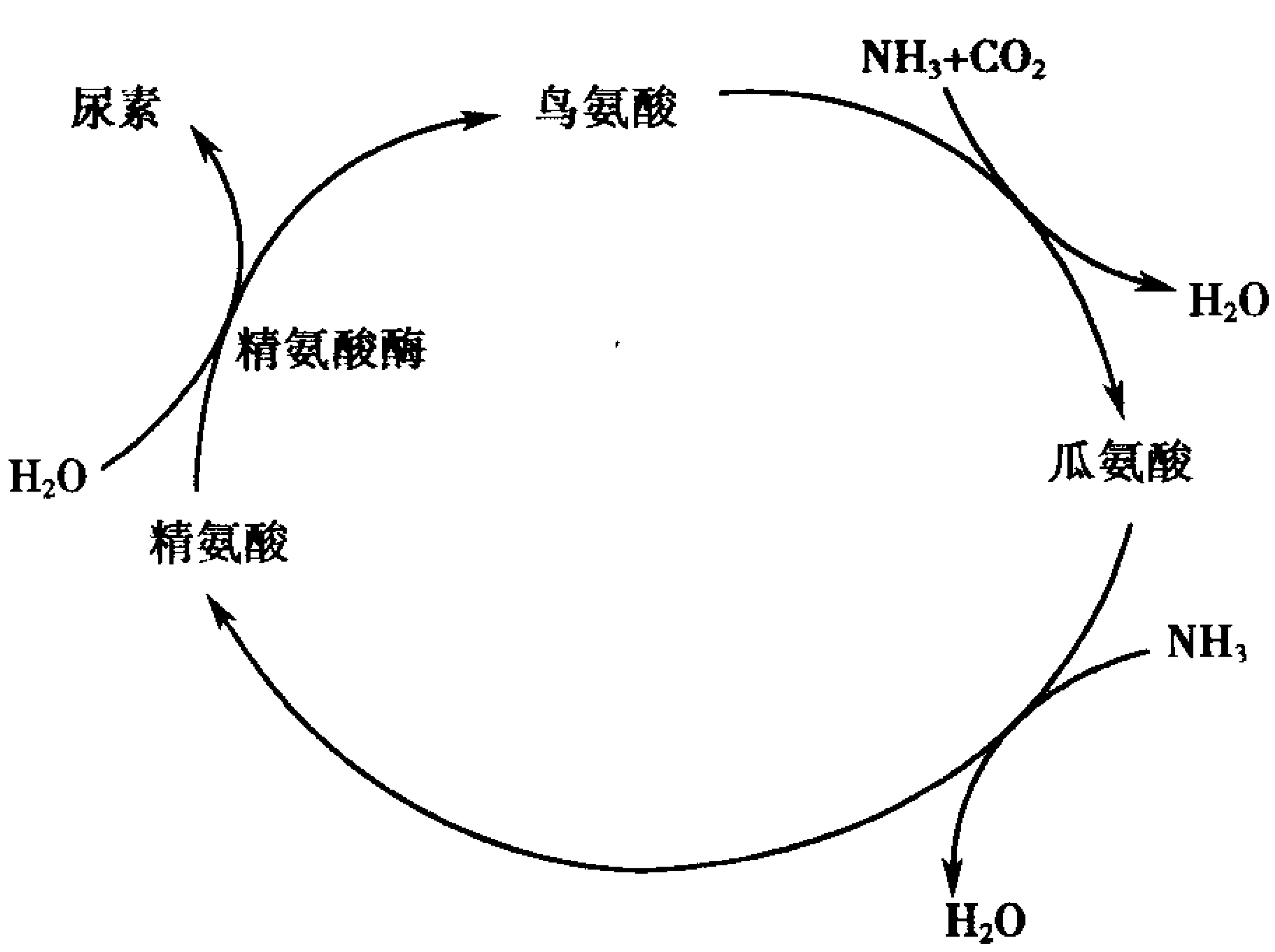
正常情况下体内的氨主要在肝合成尿素，只有少部分氨在肾以铵盐形式随尿排出。正常成人尿素占排氮总量的 80%～90%，可见肝在氨解毒中起着重要作用。

（一）Krebs 提出尿素是通过鸟氨酸循环合成的学说

肝如何合成尿素？早在 1932 年，德国学者 H. Krebs 和 K. Henseleit 根据一系列实验，首次提出了鸟氨酸循环（ornithine cycle）学说，又称尿素循环（urea cycle）或 Kerbs-Henseleit 循环。Krebs 一生中提出两个重要的循环学说（还有三羧酸循环），为生物化学的发展做出了重大贡献。Krebs 根据什么线索提出这个学说？此学说又是如何证实的？20 世纪 30 年代，组织切片技术已普遍应用于中间代谢的研究。这为研究尿素的合成机制提供了有利条件。用大鼠肝的薄切片和多种可能有关的代谢物与铵盐共同保温，发现鸟氨酸（ornithine）和瓜氨酸（citrulline）都有催化铵盐合成尿素的作用。赖氨酸与鸟氨酸的结构非常相似，却无这种作用。所以较合理的解释是，在尿素合成的一系列反应中，应当包括 NH_3、CO_2 和鸟氨酸化合生成一中间化合物。这个中间化合物在肝中能以合理的速度生成尿素，同时再生成鸟氨酸。精氨酸符合作为这个中间化合物的要求，下式表示这种关系。

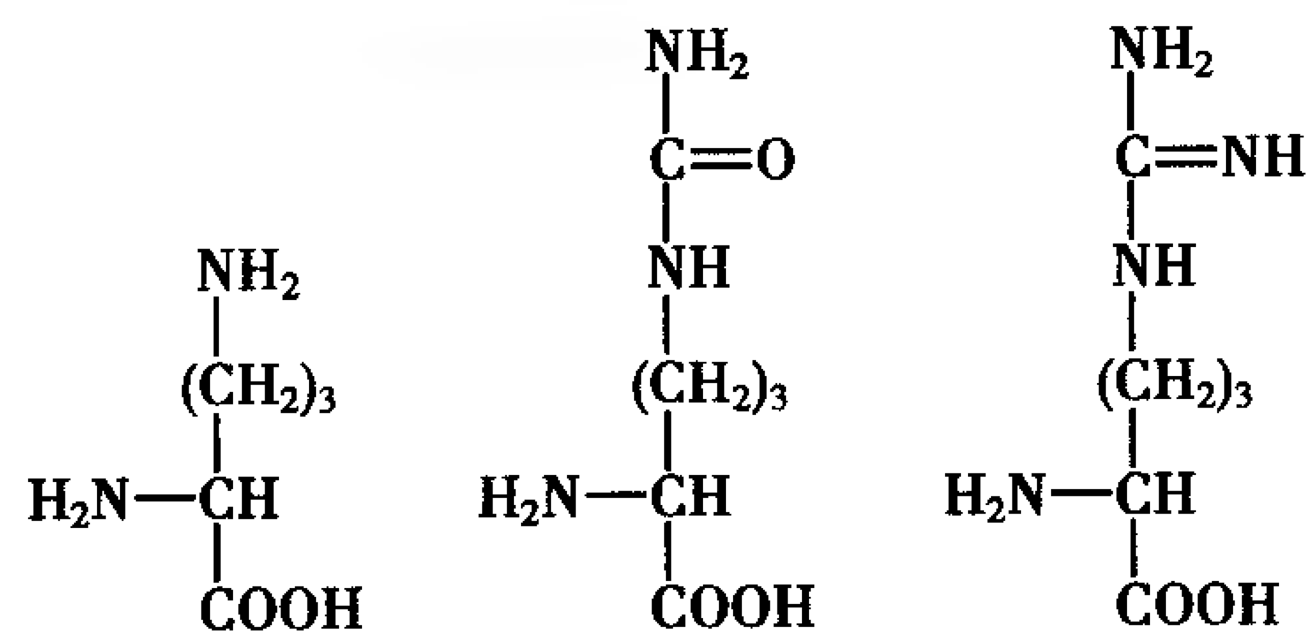


上述两个反应的结果是鸟氨酸催化 NH_3 和 CO_2 生成尿素。这个学说说明鸟氨酸在合成尿素时起催化作用，而且也符合前人有关尿素合成的一些发现，即只有以尿素为主要氮代谢最终产物的哺乳类动物的肝才会有精氨酸酶（arginase）。精氨酸酶催化精氨酸水解生成尿素及鸟氨酸。鸟类氮代谢的最终产物是尿酸（uric acid）。



●图 7-9 尿素生成的鸟氨酸循环

以上述学说为基础，推断瓜氨酸是鸟氨酸转变为精氨酸的中间产物（比较这三种化合物的结构）。瓜氨酸与鸟氨酸相同，都具有催化铵盐合成尿素的作用。另外，用大量鸟氨酸和铵盐与大鼠肝切片共同保温，可观察到瓜氨酸的积存。总结以上，提出了肝中合成尿素的鸟氨酸循环学说（图 7-9）。



乌氨酸　　瓜氨酸　　精氨酸

乌氨酸循环的证实

20 世纪 40 年代，利用同位素进一步证实尿素是通过乌氨酸循环合成。重要的实验结果有以下四个方面。

1. 以含^{15}N的NH_4^+盐饲养大鼠，食入的^{15}N大部分以^{15}N尿素随尿排出。用含^{15}N的氨基酸饲养大鼠亦得相同结果。这说明氨基酸的最终代谢产物是尿素，氨是氨基酸转变成尿素的中间物之一。

2. 用含^{15}N的氨基酸饲养大鼠，自肝提取的精氨酸含^{15}N。再用提取的精氨酸与精氨酸酶一起保温，生成的尿素分子中，其两个氮原子都含^{15}N，但乌氨酸不含^{15}N。

3. 用第 3、第 4 及第 5 位上含有重氢的乌氨酸饲养小白鼠，自肝提取的精氨酸亦含有重氢。同位素分布的位置和量都与乌氨酸相同。

4. 用$H^{14}CO_3^-$盐和乌氨酸与大鼠肝匀浆一起保温，生成的尿素和瓜氨酸的 C═O 基都含^{14}C，且量相等。

上述实验结果说明尿素是通过乌氨酸循环合成的正确性。

（二）肝中乌氨酸循环合成尿素的详细步骤

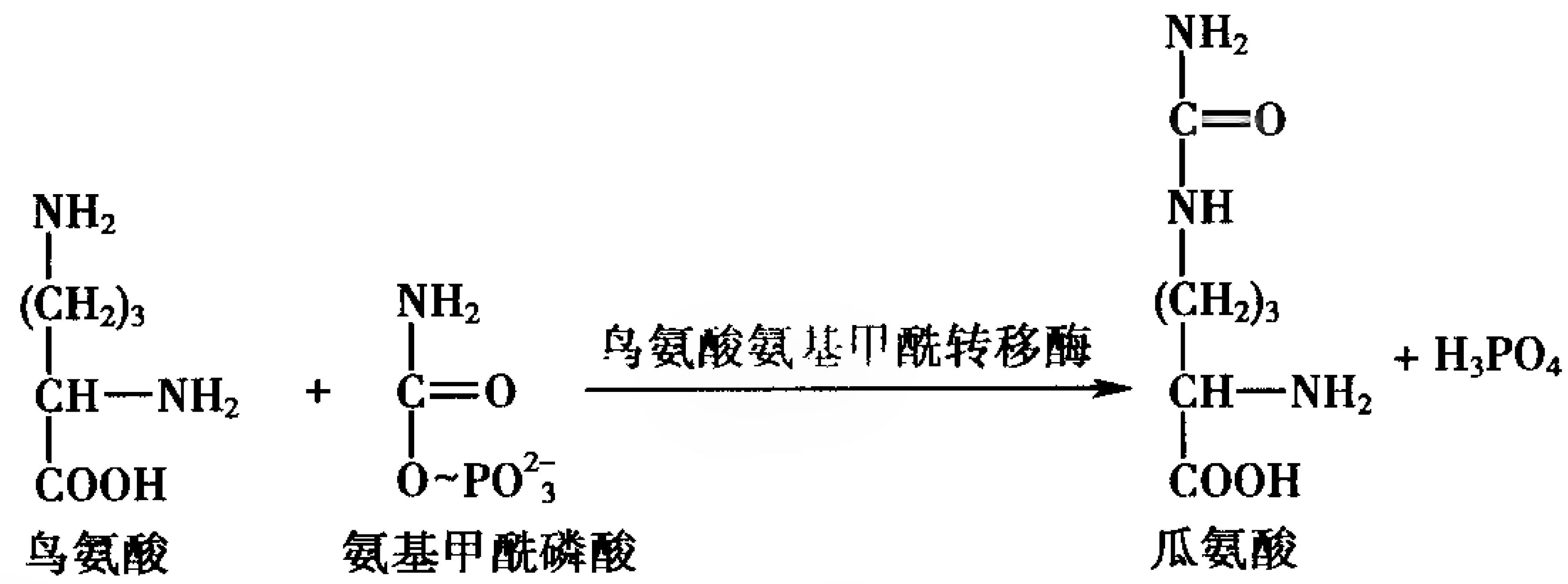
乌氨酸循环的具体过程比较复杂，大体可分为以下五步。

1. NH_3、CO_2 和 ATP 缩合生成氨基甲酰磷酸（carbamoyl phosphate）　尿素的生物合成始于氨基甲酰磷酸的生成。在 Mg^{2+}、ATP 及 N-乙酰谷氨酸（N-acetyl glutamic acid，AGA）存在时，NH_3 与 CO_2 可由氨基甲酰磷酸合成酶 I（carbamoyl phosphate synthetase I，CPS-I）催化生成氨基甲酰磷酸。

$$NH_3 + CO_2 + H_2O + 2ATP \xrightarrow[\text{N-乙酰谷氨酸，}Mg^{2+}]{\text{氨基甲酰磷酸合成酶I}} H_2N-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O\sim PO_3^{2-} + 2ADP + Pi$$

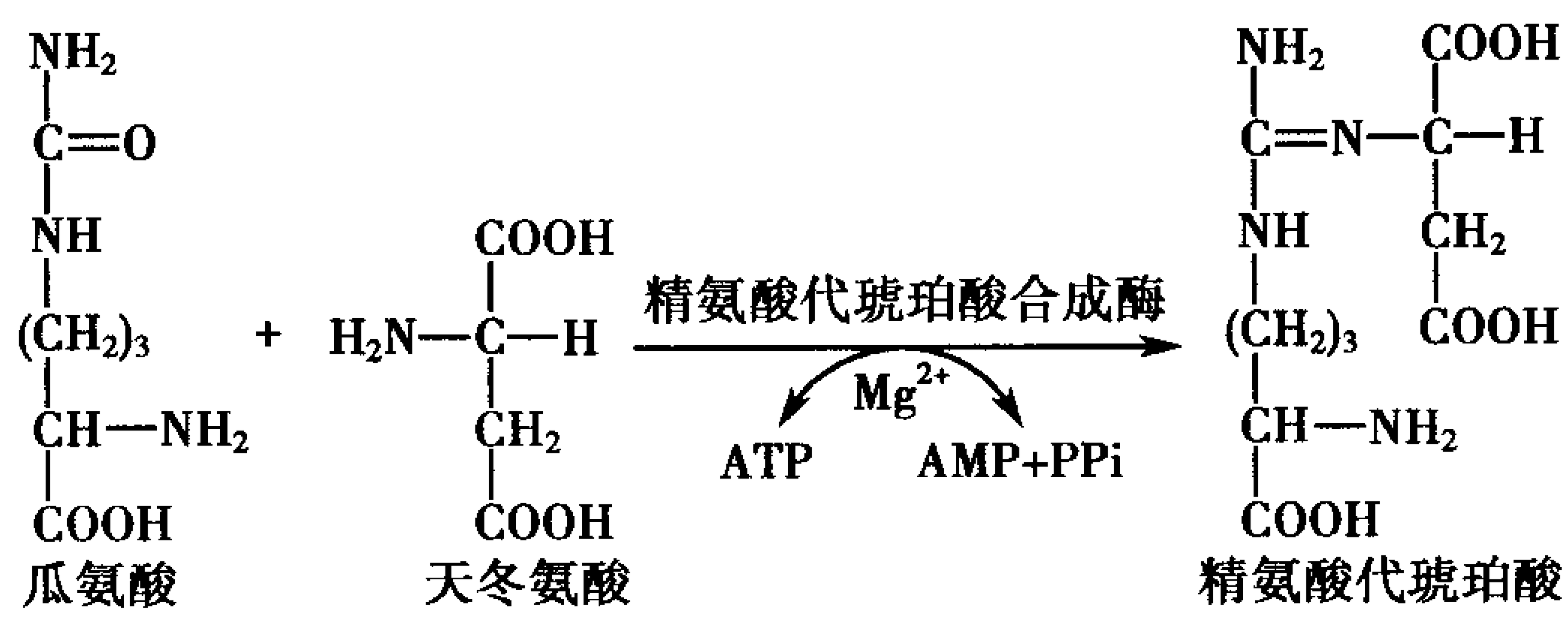
此反应消耗 2 分子 ATP，为酰胺键和酸酐键的合成提供驱动力。CPS-I 是乌氨酸循环过程中的限速酶，催化不可逆反应。此酶只有在变构激活剂 N-乙酰谷氨酸存在时才能被激活，N-乙酰谷氨酸可诱导 CPS-I 的构象发生改变，进而增加酶对 ATP 的亲和力。CPS-I 和 AGA 都存在于肝细胞线粒体中。

2. 氨基甲酰磷酸与乌氨酸反应生成瓜氨酸　在乌氨酸氨基甲酰转移酶（ornithine carbamoyl transferase，OCT）催化下，氨基甲酰磷酸上的氨基甲酰部分转移到乌氨酸上，生成瓜氨酸和磷酸。

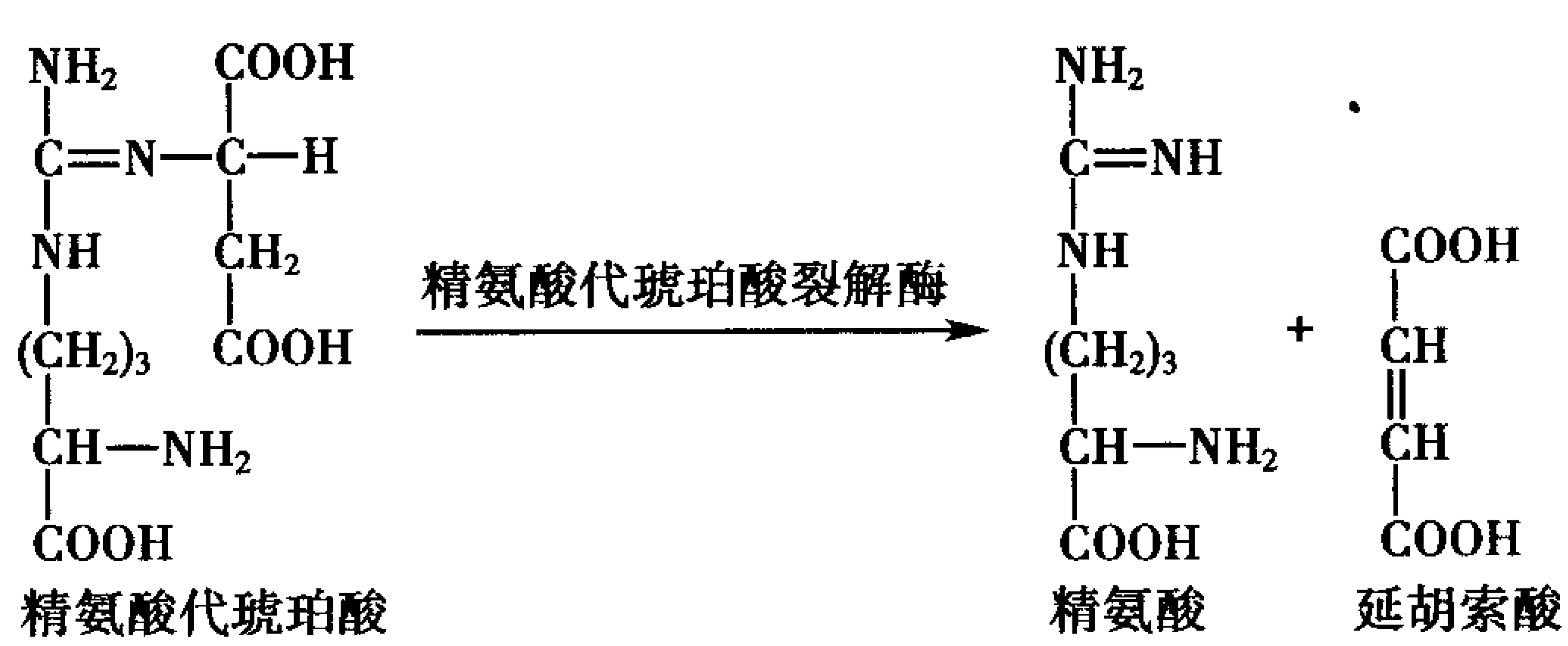


此反应不可逆。OCT 也存在于肝细胞的线粒体中。

3. 瓜氨酸与天冬氨酸反应生成精氨酸代琥珀酸 瓜氨酸在线粒体合成后，即被转运到线粒体外，在胞液中经精氨酸代琥珀酸合成酶（argininosuccinate synthetase）催化，与天冬氨酸反应生成精氨酸代琥珀酸，此反应由 ATP 供能。天冬氨酸提供了尿素分子的第二个氮原子。

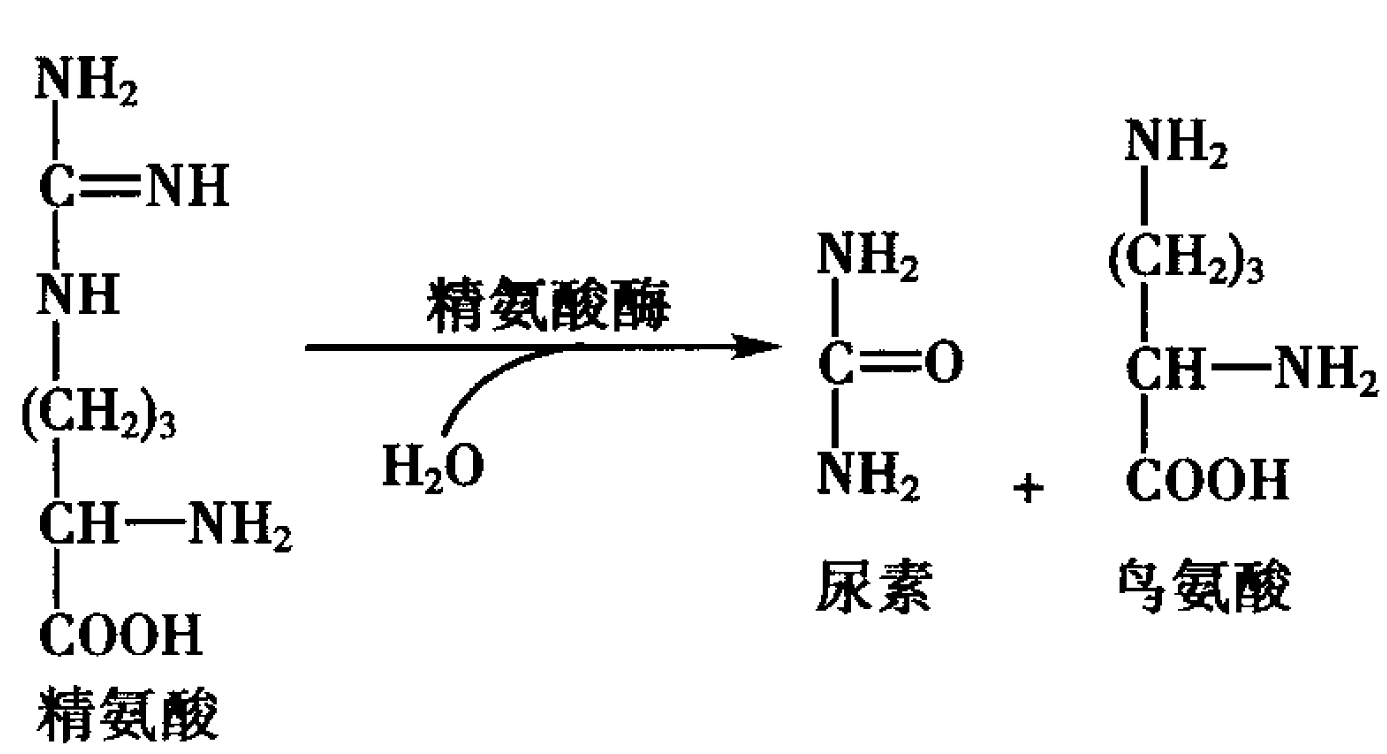


4. 精氨酸代琥珀酸裂解成精氨酸与延胡索酸 精氨酸代琥珀酸在精氨酸代琥珀酸裂解酶的催化下，裂解成精氨酸与延胡索酸。反应产物精氨酸分子中保留了来自游离 NH_3 和天冬氨酸分子的氮。



上述反应裂解生成的延胡索酸可经三羧酸循环的中间步骤转变成草酰乙酸，后者与谷氨酸进行转氨基反应，又可重新生成天冬氨酸，而谷氨酸的氨基可来自体内的多种氨基酸。由此可见，体内多种氨基酸的氨基可通过天冬氨酸的形式参与尿素的合成。

5. 精氨酸水解释放尿素并再生成鸟氨酸 在胞液中，精氨酸由精氨酸酶催化，水解生成尿素和鸟氨酸。鸟氨酸通过线粒体内膜上载体的转运再进入线粒体，参与瓜氨酸的合成。如此反复，完成鸟氨酸循环。



尿素作为代谢终产物排出体外。综上所述，尿素合成的总反应为：

$$2NH_3 + CO_2 + 3ATP + 3H_2O \rightleftharpoons H_2N—CO—NH_2 + 2ADP + AMP + 4Pi$$

尿素合成的中间步骤及其在细胞中的定位总结于图 7-10。

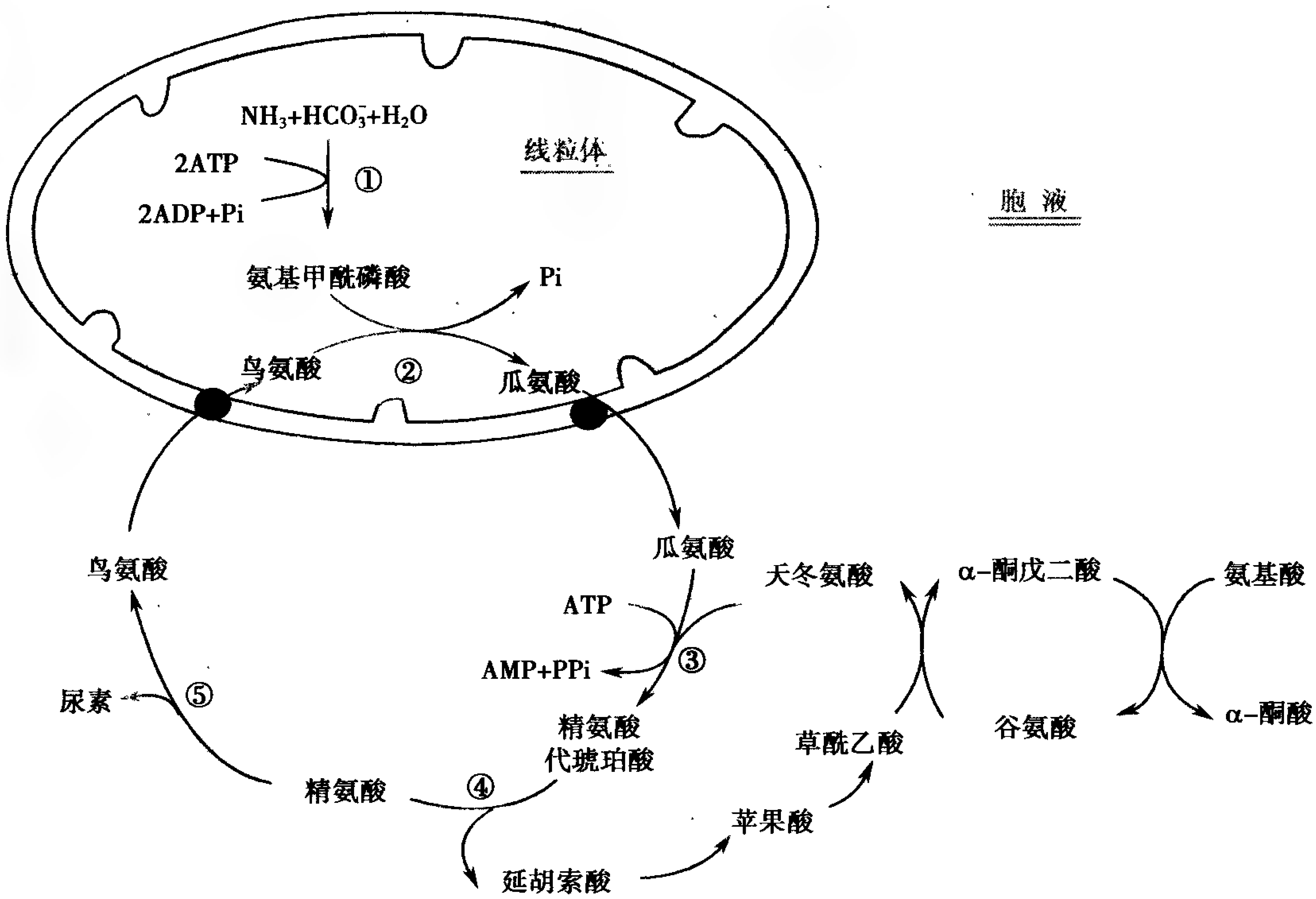


图 7-10　尿素生成的中间步骤和细胞定位

①氨基甲酰磷酸合成酶 I；②鸟氨酸氨基甲酰转移酶；③精氨酸代琥珀酸合成酶；④精氨酸代琥珀酸裂解酶；⑤精氨酸酶

(三) 尿素合成受膳食蛋白质和两种限速酶活性的调节

1. 高蛋白质膳食促进尿素合成　尿素合成受食物蛋白质的影响。高蛋白质膳食时，蛋白质分解增多，尿素合成速度加快，尿素可占排出氮的 90%；反之，低蛋白质膳食时，尿素合成速度减慢，尿素约占排出氮的 60%。

2. AGA 激活 CPS-I 启动尿素合成　CPS-I 是鸟氨酸循环启动的限速酶。如前所述，AGA 是 CPS-I 的变构激活剂，它由乙酰 CoA 与谷氨酸通过 AGA 合成酶催化而生成。精氨酸是 AGA 合成酶的激活剂，精氨酸浓度增高时，尿素合成增加。

3. 精氨酸代琥珀酸合成酶活性促进尿素合成　参与尿素合成的酶系中，精氨酸代琥珀酸合成酶的活性最低，是尿素合成启动以后的限速酶，可调节尿素的合成速度。

(四) 尿素合成障碍可引起高血氨症与氨中毒

在正常生理情况下，血氨的来源与去路保持动态平衡，而氨在肝中合成尿素是维持这种平衡的关键。当某种原因，例如肝功能严重损伤或尿素合成相关酶的遗传性缺陷时，都可导致尿素合成发生障碍，使血氨浓度升高，称为高血氨症（hyperammonemia）。常见的临床症状包括呕吐、厌食、间歇性共济失调、嗜睡甚至昏迷等。高血氨的毒性作用机制尚不完全清楚。一般认为，氨进入脑组织，可与脑中的 α-酮戊二酸结合生成谷氨酸，氨也可与脑中的谷氨酸进一步结合生成谷氨酰胺。高血氨时脑中氨的增加可使脑细胞中的 α-酮戊二酸减少，导致三羧酸循环减弱，ATP 生成减少，导致大脑功能障碍，严重时可发生昏

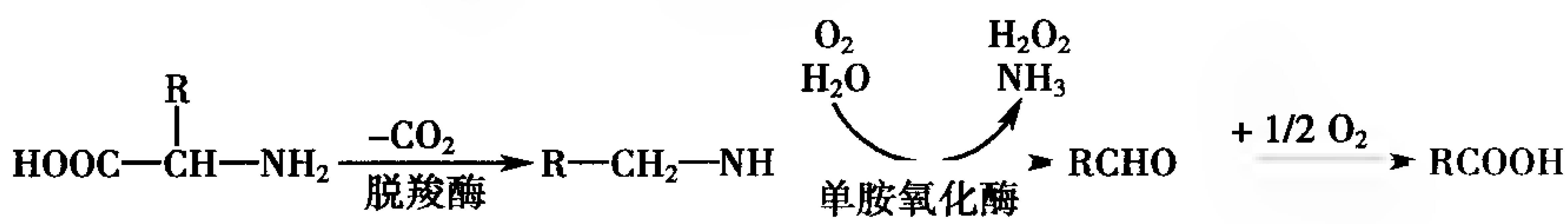
迷。另一种可能性是谷氨酸、谷氨酰胺增多，渗透压增大引起脑水肿。

第五节　个别氨基酸的代谢

氨基酸的代谢除共有代谢途径外，因其侧链不同，有些氨基酸还有其特殊的代谢途径，并具有重要的生理意义。本节仅对几种重要的氨基酸代谢途径进行描述。

一、氨基酸的脱羧基作用产生特殊的胺类化合物

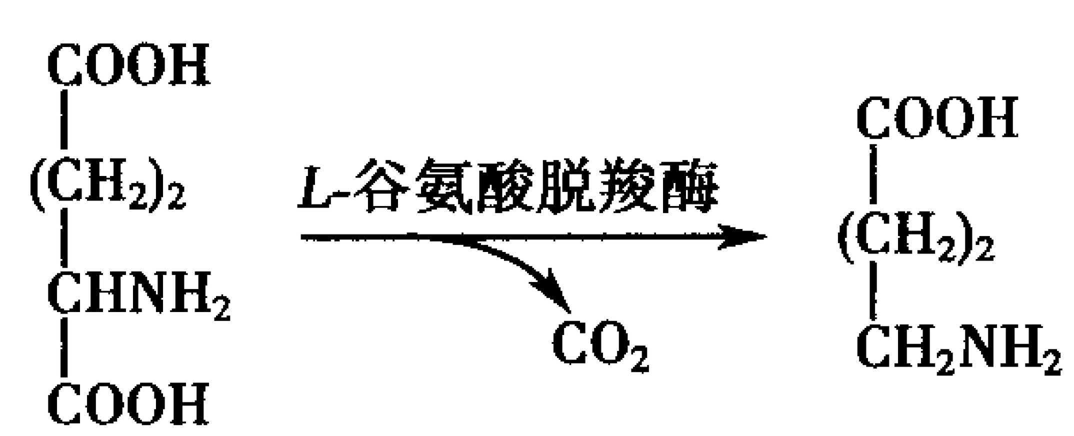
有些氨基酸可通过脱羧基作用（decarboxylation）生成相应的胺类。催化脱羧基反应的酶称脱羧酶（decarboxylase）。氨基酸脱羧酶的辅酶是磷酸吡哆醛。体内胺类含量虽然不高，但具有重要的生理功能。体内广泛存在胺氧化酶（amine oxidase），能将胺氧化成相应的醛、NH_3 和 H_2O。醛类可继续氧化成羧酸，羧酸再氧化成 CO_2 和 H_2O 或随尿排出，从而避免胺类的蓄积。胺氧化酶属于黄素蛋白，在肝中活性最高。



氨基酸　　胺　　醛　　羧酸

（一）谷氨酸经谷氨酸脱羧酶催化生成 γ-氨基丁酸

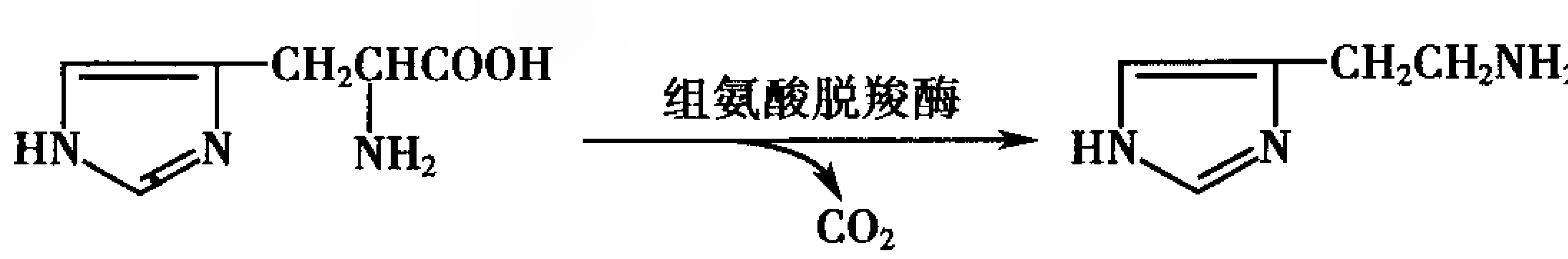
谷氨酸脱羧基生成 γ-氨基丁酸（γ-aminobutyric acid，GABA），反应由 *L*-谷氨酸脱羧酶催化，此酶在脑及肾组织中活性很高，因而 γ-氨基丁酸在脑组织中的浓度较高。GABA 是抑制性神经递质，对中枢神经有抑制作用。



谷氨酸　　γ-氨基丁酸

（二）组氨酸经组氨酸脱羧酶催化生成组胺

组氨酸脱羧基生成组胺（histamine），反应由组氨酸脱羧酶催化。组胺在体内分布广泛，乳腺、肺、肝、肌及胃黏膜中含量较高，主要存在于肥大细胞中。



组氨酸　　组胺

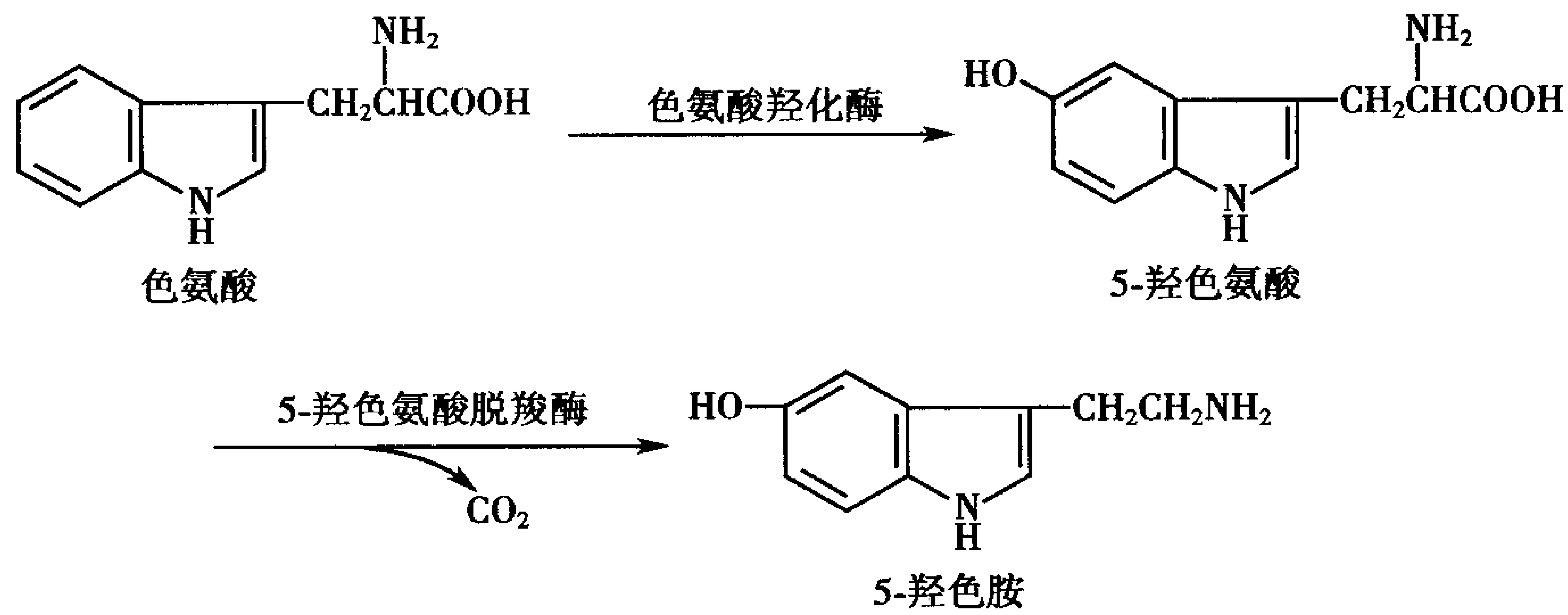
组胺是一种强烈的血管扩张剂，并能增加毛细血管的通透性。组胺可使平滑肌收缩，引起支气管痉挛导致哮喘。组胺还能促进胃黏膜细胞分泌胃蛋白酶原及胃酸。

（三）色氨酸经 5-羟色氨酸生成 5-羟色胺

色氨酸首先经色氨酸羟化酶催化生成 5-羟色氨酸（5-hydroxytryptophan），然后经 5-羟色氨酸脱羧酶催化生成 5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）。

5-羟色胺广泛分布于体内各组织，除神经组织外，还存在于胃肠、血小板及乳腺细胞中。脑组织中的 5-羟色胺是一种神经递质，具有抑制作用，直接影响神经传导。在外周组织，5-羟色胺具有强烈的血管收缩作用。5-羟色胺经单胺氧化酶催化生成 5-羟色醛，进一

步氧化生成5-羟吲哚乙酸随尿排出。



(四) 某些氨基酸的脱羧基作用可产生多胺类物质

多胺是指含有多个氨基的化合物。在体内，某些氨基酸经脱羧基作用可以产生多胺类物质。例如鸟氨酸经脱羧基作用生成腐胺（putrescine），然后腐胺又可转变成精脒（spermidine）及精胺（spermine）。

L-鸟氨酸 $\xrightarrow[\searrow CO_2]{\text{鸟氨酸脱羧酶}}$ $H_2N—(CH_2)_4—NH_2$ (腐胺)

S-腺苷甲硫氨酸(SAM) $\xrightarrow[\searrow CO_2]{\text{SAM脱羧酶}}$ 腺苷—S—$(CH_2)_3$—NH_2 (脱羧基SAM)

腐胺 + 脱羧基SAM $\xrightarrow[\searrow \text{腺苷—S—}CH_3]{\text{丙胺转移酶}}$ $H_2N—(CH_2)_4—NH—(CH_2)_3—NH_2$ (精脒)

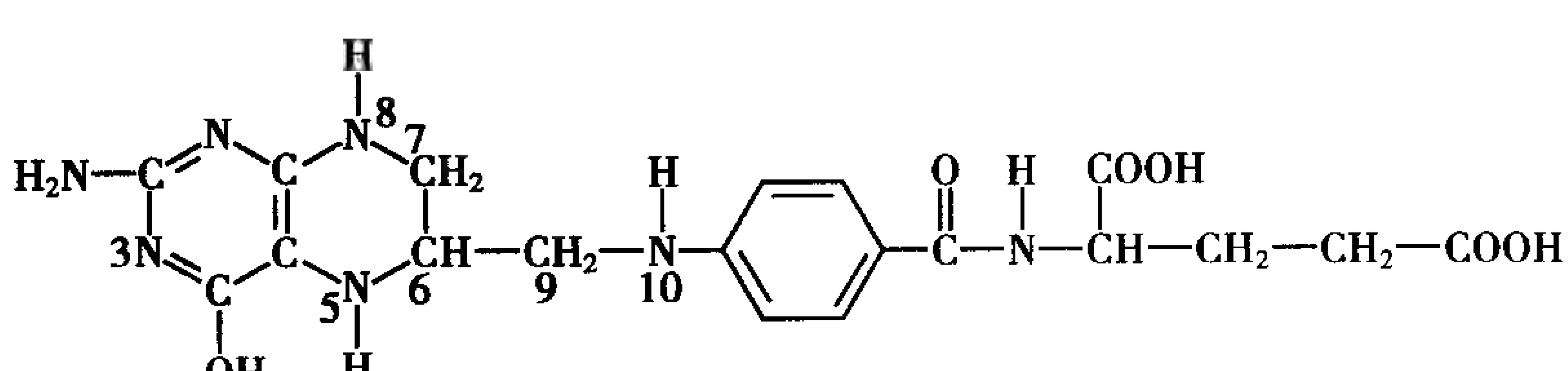
精脒 + 脱羧基SAM $\xrightarrow[\searrow \text{腺苷—S—}CH_3]{\text{丙胺转移酶}}$ $H_2N—(CH_2)_3—NH—(CH_2)_4—NH—(CH_2)_3—NH_2$ (精胺)

鸟氨酸脱羧酶（orinithine decarboxylase）是多胺（polyamine）合成的限速酶。精胺与精脒是调节细胞生长的重要物质。凡生长旺盛的组织，如胚胎、再生肝、癌瘤组织等，鸟氨酸脱羧酶的活性和多胺的含量都有所增加。多胺促进细胞增殖的机制可能与其稳定细胞结构，与核酸分子结合及促进核酸和蛋白质的生物合成有关。在体内多胺大部分与乙酰基结合随尿排出，小部分氧化成 CO_2 和 NH_3。目前临床上测定病人血或尿中多胺的水平来作为癌瘤辅助诊断及病情变化的生化指标之一。

二、某些氨基酸在分解代谢中产生一碳单位

(一) 四氢叶酸作为一碳单位的运载体参与一碳单位代谢

一碳单位（one carbon unit）是指某些氨基酸在分解代谢过程中产生的含有一个碳原子的基团，包括甲基（$—CH_3$）、甲烯基（$—CH_2—$）、甲炔基（—CH═）、甲酰基（—CHO）及亚氨甲基（—CH═NH）等。一碳单位不能游离存在，常与四氢叶酸（tetrahydrofolic acid，FH_4）结合而转运和参与代谢。四氢叶酸是一碳单位的运载体。在体内，四氢叶酸经二氢叶酸还原酶（dihydrofolate reductase）催化，分两步还原反应生成。

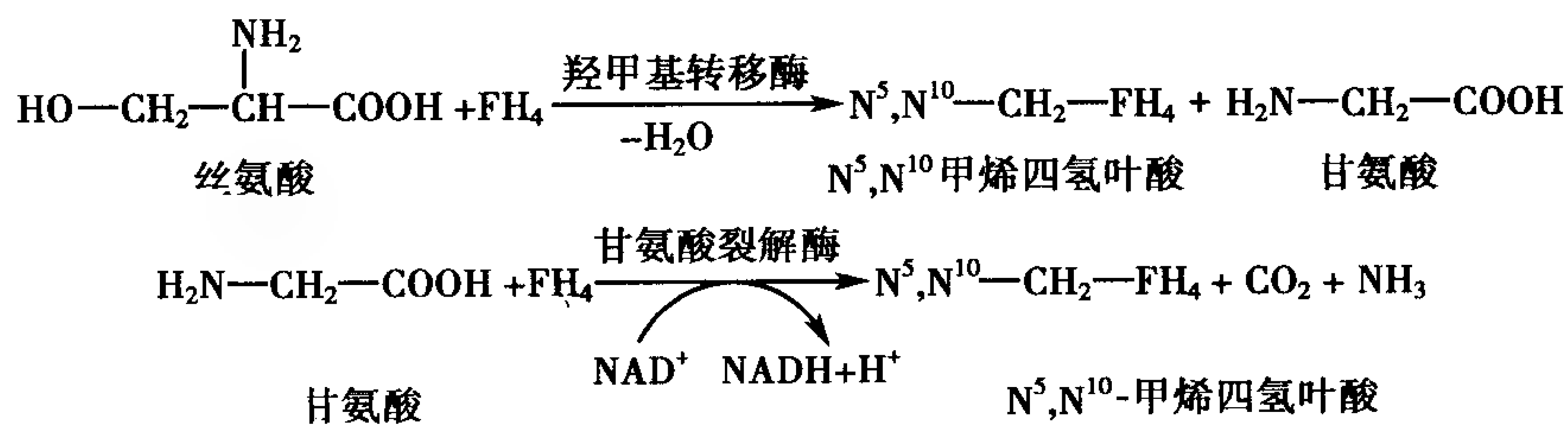


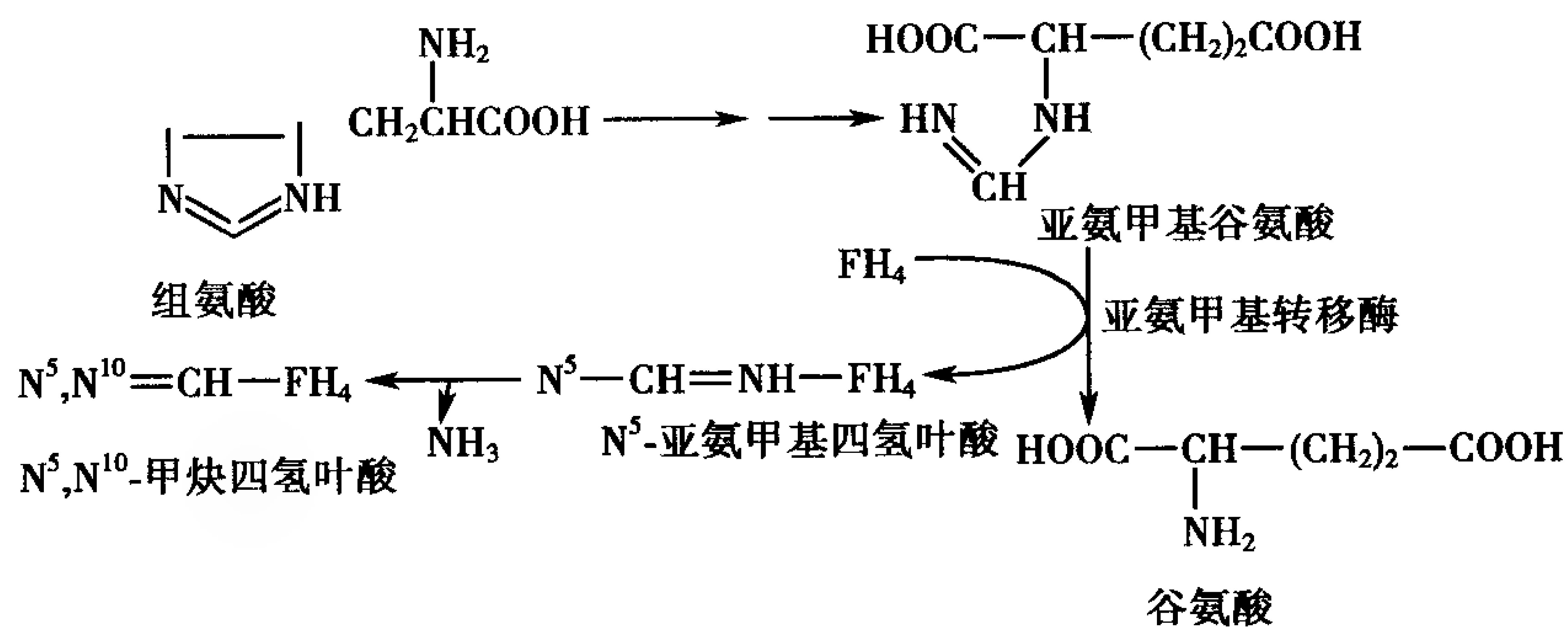
5,6,7,8-四氢叶酸(FH_4)

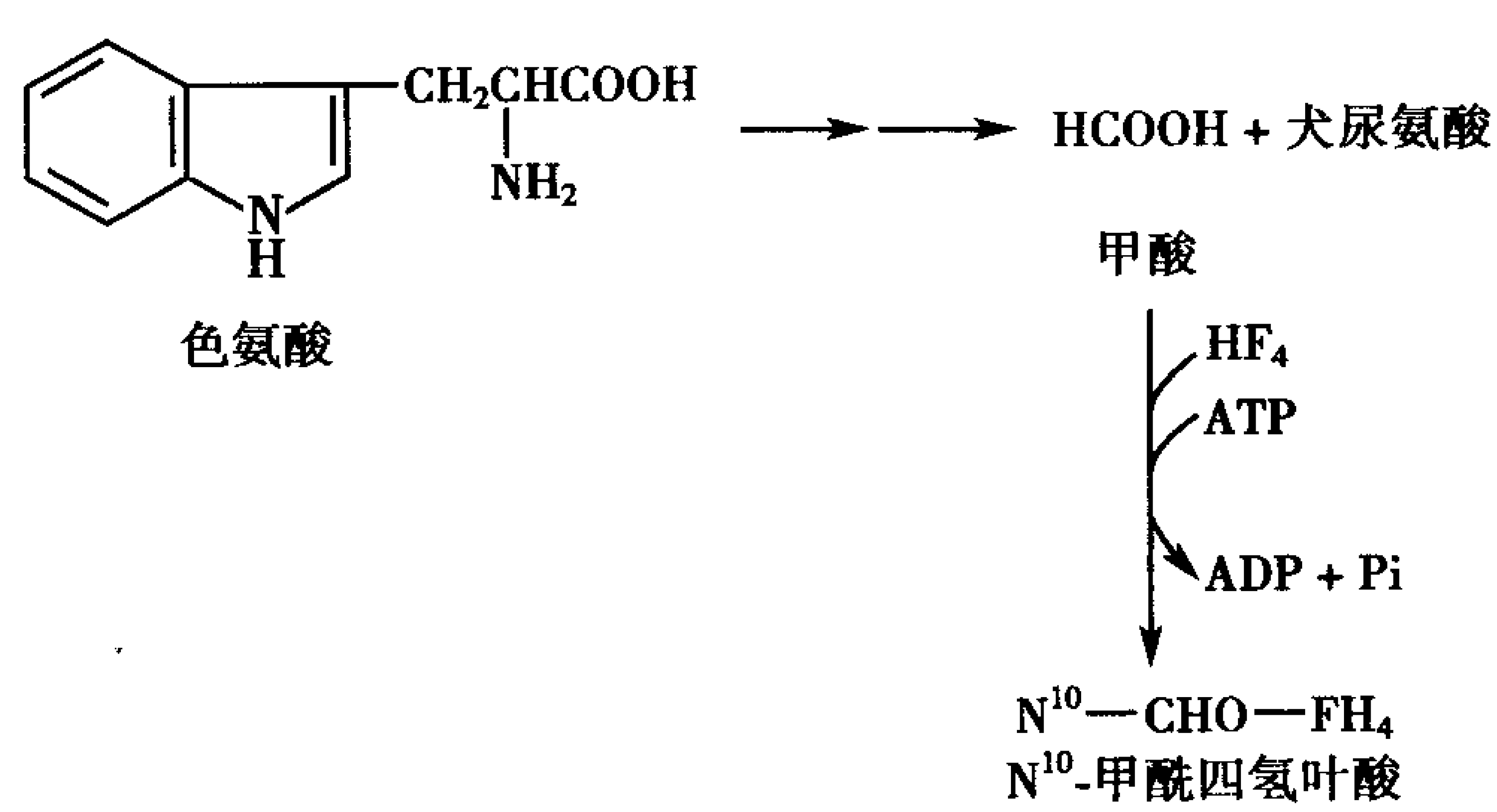


（二）由氨基酸产生的一碳单位可相互转变

一碳单位主要来自丝氨酸、甘氨酸、组氨酸及色氨酸的分解代谢。一碳单位由氨基酸生成的同时即结合在四氢叶酸的 N^5、N^{10} 位上。四氢叶酸的 N^5 结合甲基或亚氨甲基，N^5 和 N^{10} 结合甲烯基或甲炔基，N^5 或 N^{10} 结合甲酰基。例如：





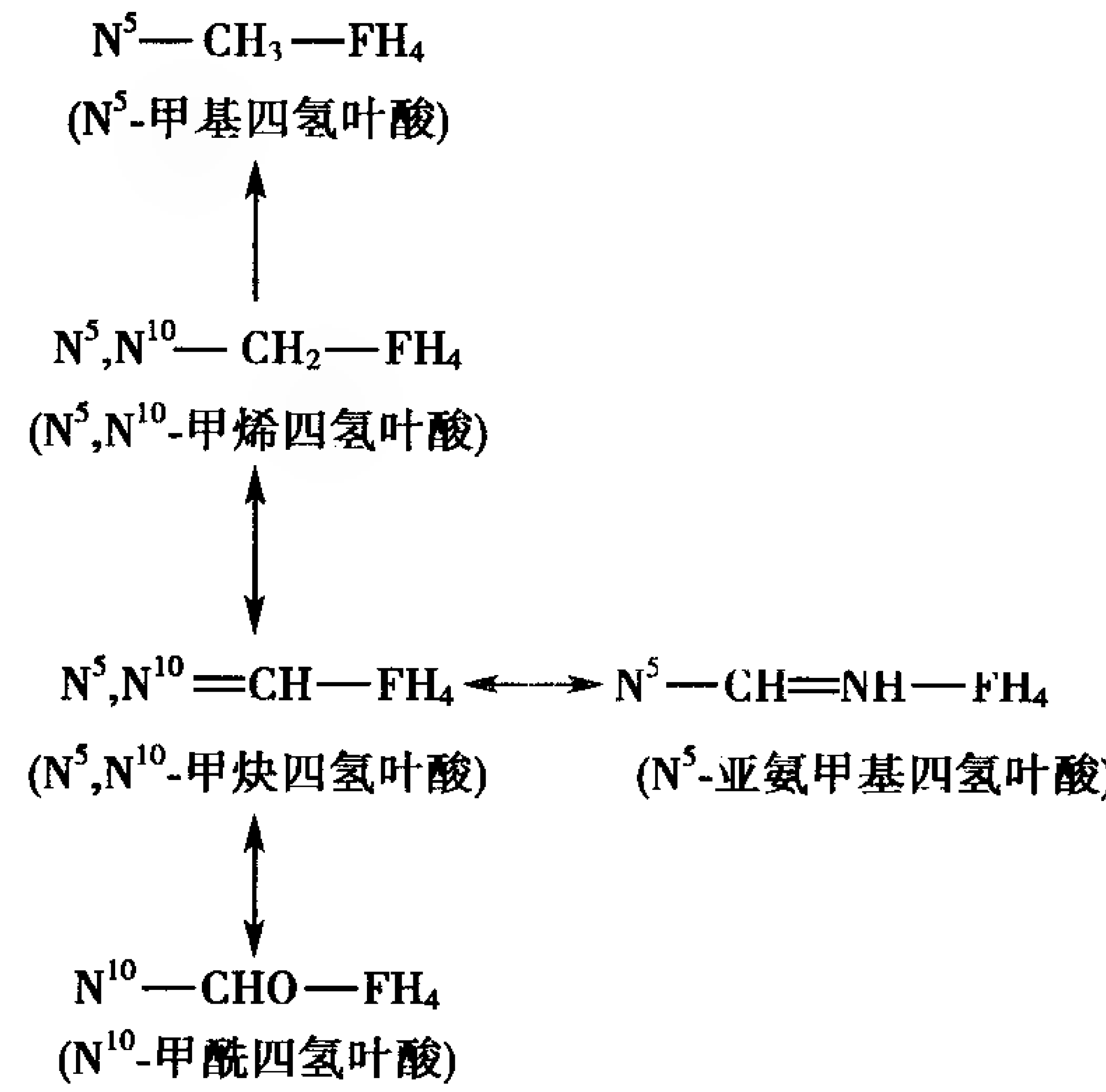


各种不同形式的一碳单位中，碳原子的氧化状态不同。在适当条件下，它们可以通过氧化还原反应而彼此转变（图 7-11）。但是在这些反应中，N^5-甲基四氢叶酸的生成是不可逆的。

（三）一碳单位的主要功能是参与嘌呤、嘧啶的合成

氨基酸分解代谢过程中产生的一碳单位可作为嘌呤、嘧啶的合成原料。例如，N^{10}—CHO—FH_4 与 N^5，N^{10}=CH—FH_4 分别为嘌呤合成提供 C_2 与 C_8，N^5，N^{10}—CH_2—FH_4 为胸腺嘧啶核苷酸合成提供甲基，故一碳单位在核酸的生物合成中具有重要作用。一碳单位将氨基酸代谢与核苷酸代谢密切联系起来。一碳单位代谢障碍或 FH_4 不足时，可引起巨幼红细胞性贫血等疾病。应用磺胺类药物可抑制细菌合成叶酸，进而抑制细菌生长，但对人体影响不大。应用叶酸类似物如氨甲蝶呤等可抑制 FH_4 的生成，从而抑制核酸的合成，达到抗癌作用。

三、含硫氨基酸的代谢是相互联系的

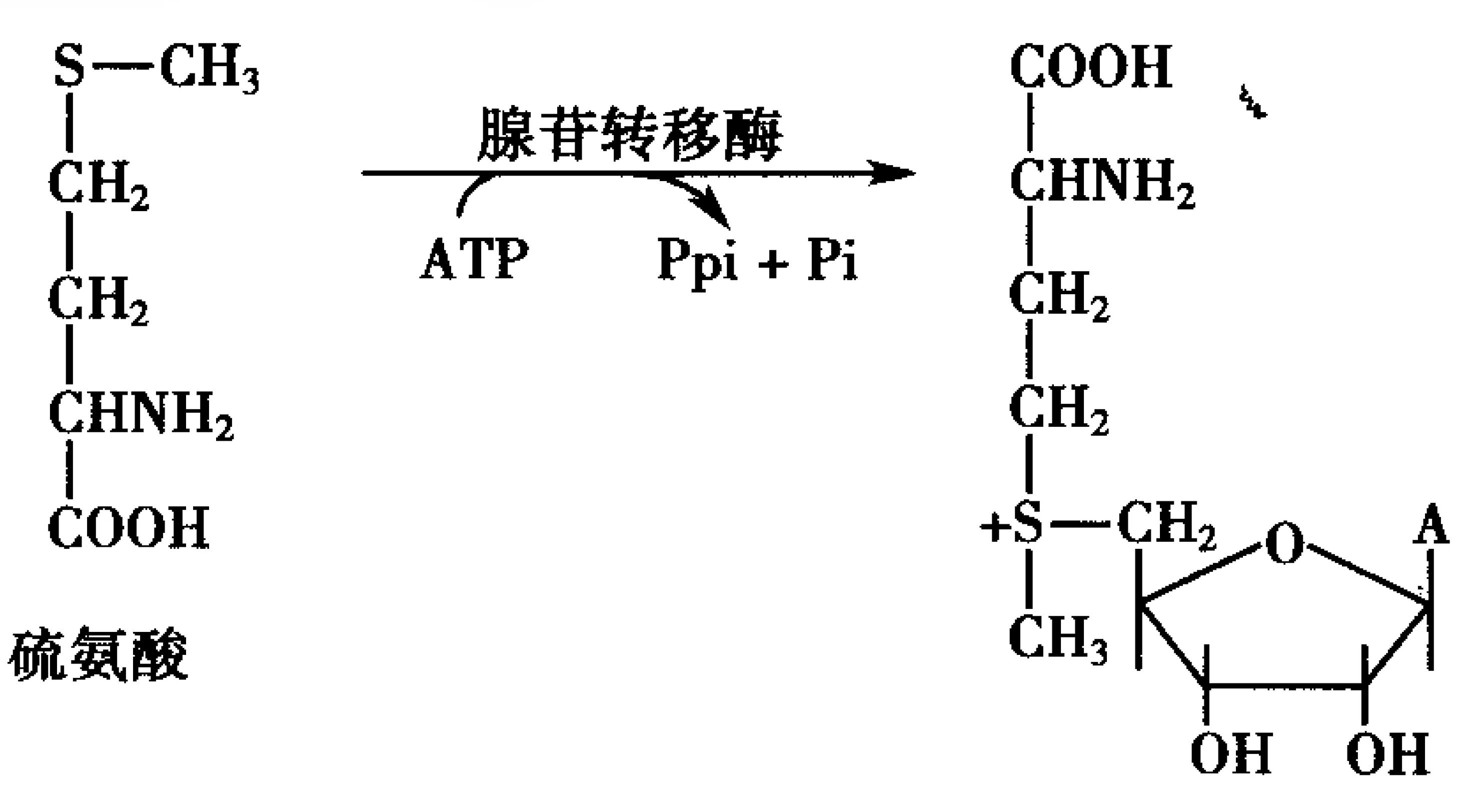


● 图 7-11 各种不同形式一碳单位的转换

含硫氨基酸包括甲硫氨酸、半胱氨酸和胱氨酸。这三种氨基酸的代谢是相互联系的，甲硫氨酸可以转变为半胱氨酸和胱氨酸，而且半胱氨酸和胱氨酸可以互相转变，但两者都不能转变为甲硫氨酸，所以甲硫氨酸是营养必需氨基酸。

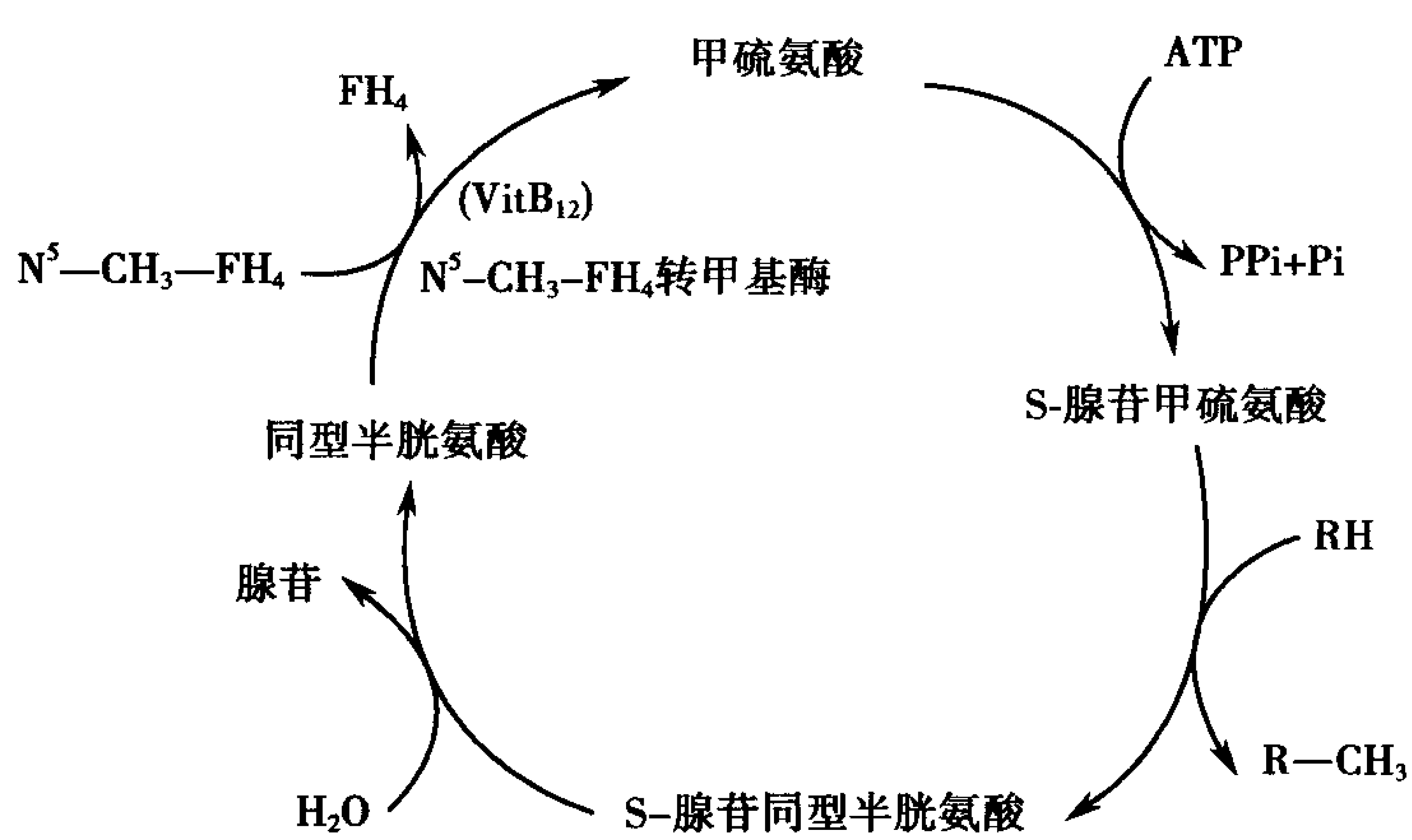
(一) 甲硫氨酸参与甲基转移

1. 甲硫氨酸转甲基作用与甲硫氨酸循环有关 甲硫氨酸分子中含有 S-甲基，通过各种转甲基作用可生成多种含甲基的生理活性物质，如肾上腺素、肉碱、胆碱及肌酸等。在转甲基反应前，甲硫氨酸必须在腺苷转移酶(adenosyl transferase)的催化下与 ATP 反应，生成 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine，SAM)，SAM 中的甲基称为活性甲基，SAM 称为活性甲硫氨酸。SAM 是体内甲基最重要的直接供体。据统计，体内约有 50 余种物质需要 SAM 提供甲基，生成甲基化合物。



甲硫氨酸　　　　S-腺苷甲硫氨酸

S-腺苷甲硫氨酸经甲基转移酶（methyl transferase）催化，将甲基转移至另一种物质，使其甲基化（methylation），而 S-腺苷甲硫氨酸去甲基后生成 S-腺苷同型半胱氨酸，后者脱去腺苷生成同型半胱氨酸（homocysteine）。同型半胱氨酸再接受 N^5—CH_3—FH_4 上的甲基，重新生成甲硫氨酸，形成一个循环过程，称为甲硫氨酸循环（methionine cycle)(图 7-12)。此循环的生理意义是由 N^5—CH_3—FH_4 供给甲基生成甲硫氨酸，再通过此



● 图 7-12 甲硫氨酸循环

循环的 SAM 提供甲基，以进行体内广泛存在的甲基化反应，由此，$N^5—CH_3—FH_4$ 可看成是体内甲基的间接供体。

在甲硫氨酸循环反应中，虽然同型半胱氨酸接受甲基后生成甲硫氨酸，但体内不能合成同型半胱氨酸，它只能由甲硫氨酸转变而来，故甲硫氨酸不能在体内合成，必须由食物提供。

$N^5—CH_3—FH_4$ 提供甲基使同型半胱氨酸转变成甲硫氨酸的反应由 N^5-甲基四氢叶酸转甲基酶催化，此酶又称甲硫氨酸合成酶，其辅酶是维生素 B_{12}，它参与甲基的转移。维生素 B_{12} 缺乏时，$N^5—CH_3—FH_4$ 上的甲基不能转移给同型半胱氨酸。这不仅影响甲硫氨酸的合成，同时也影响四氢叶酸的再生，使组织中游离的四氢叶酸含量减少，导致核酸合成障碍，影响细胞分裂。因此，维生素 B_{12} 不足时可引起巨幼红细胞性贫血，同时同型半胱氨酸在血中浓度升高，可能是动脉粥样硬化和冠心病的独立危险因子。

同型半胱氨酸与心血管疾病

早在 1969 年，Mc Cully 博士报道由于遗传缺陷造成甲硫氨酸代谢障碍，引起体内同型半胱氨酸含量高达几百 nmol/L，患儿往往由于严重的心血管疾病而早死。近年来科学家将同型半胱氨酸与胆固醇一起归为导致心脏病的独立致病因子，进一步研究发现同型半胱氨酸作用机制，包括刺激心血管细胞增殖等多种作用，引起更为广泛的医学问题。有关导致血中同型半胱氨酸浓度升高的原因、致病机制及可能导致的疾病见下列附表。

浓度升高的原因	致病机制	所致疾病
遗传性疾病	损伤血管内皮细胞	心脏病发作
B 族维生素缺乏	促进血小板的激活	中风
（叶酸、B_6 及 B_{12}）	增强凝血功能	静脉栓塞
雌激素缺乏	促进血管平滑肌增殖	反复流产
过度摄入无过滤的咖啡	刺激 LDL 氧化	新生儿缺陷，神经管缺陷
吸烟	细胞毒作用	老年性痴呆

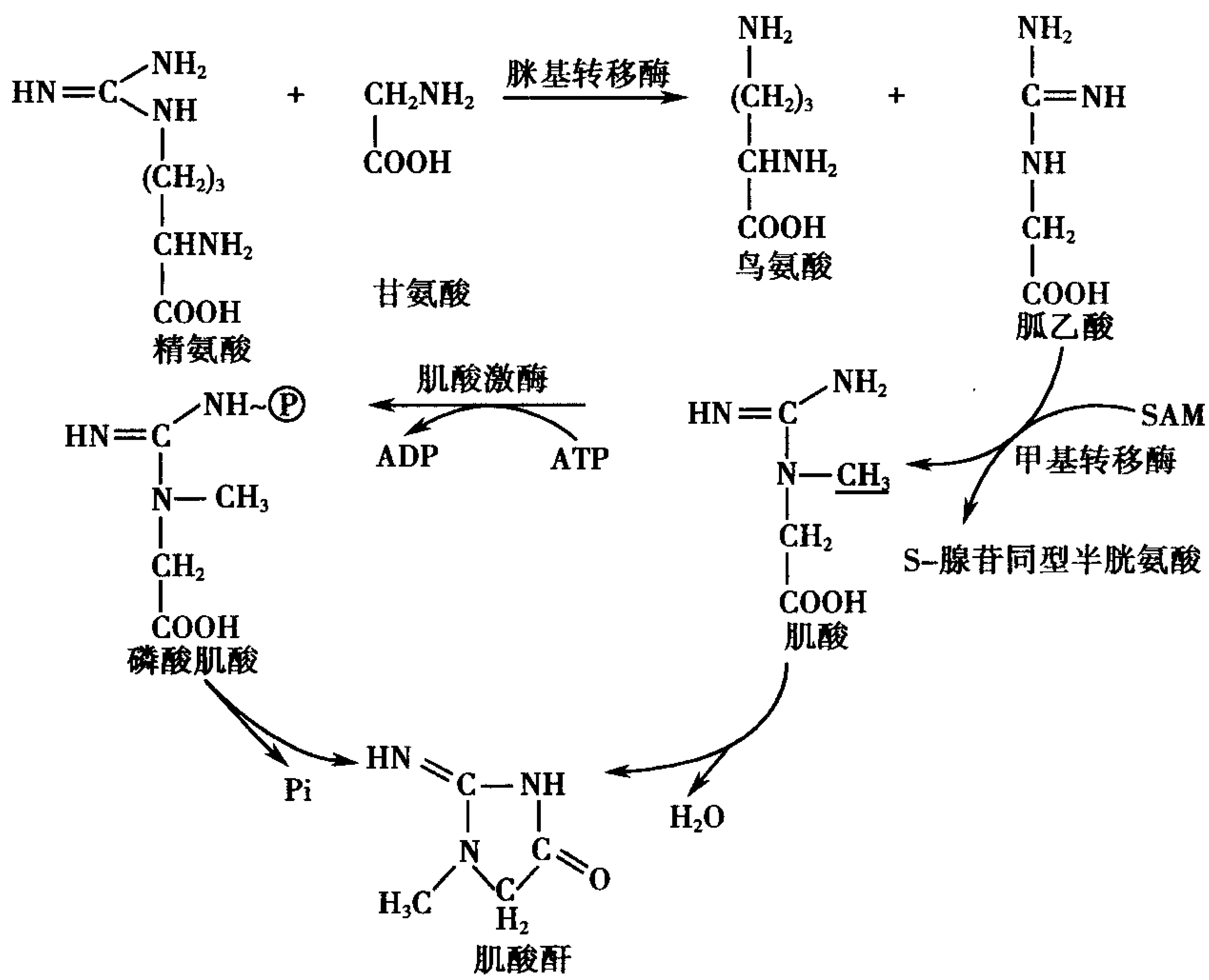
体内同型半胱氨酸主要通过两条途径进行代谢，即甲基化途径和转硫途径。甲基化途径：约 50%的同型半胱氨酸经此途径重新合成甲硫氨酸，见图 7-12；转硫途径：另约 50%的同型半胱氨酸经转硫途径不可逆生成半胱氨酸和 α-酮丁酸，此过程需维生素 B_6 依赖的胱硫醚 β 合成酶的催化。目前科学家们正试图用转硫途径等多种手段降低血中同型半胱氨酸浓度，达到预防心血管疾病等的作用。

2. 甲硫氨酸为肌酸合成提供甲基　肌酸（creatine）和磷酸肌酸（creatine phosphate）是能量储存与利用的重要化合物。肌酸以甘氨酸为骨架，由精氨酸提供脒基，S-腺苷甲硫氨酸提供甲基而合成，肝是合成肌酸的主要器官。在肌酸激酶（creatine kinase，CK）催化下，肌酸接受 ATP 的高能磷酸基形成磷酸肌酸。磷酸肌酸在心肌、骨骼肌及脑组织中含量丰富。

肌酸激酶由两种亚基组成，即 M 亚基（肌型）与 B 亚基（脑型），构成 3 种同工酶：

MM、MB和BB。它们在体内各组织中的分布不同，MM主要在骨骼肌，MB主要在心肌，而BB主要在脑。心肌梗死时，血中MB肌酸激酶活性增高，可作为辅助诊断的指标之一。

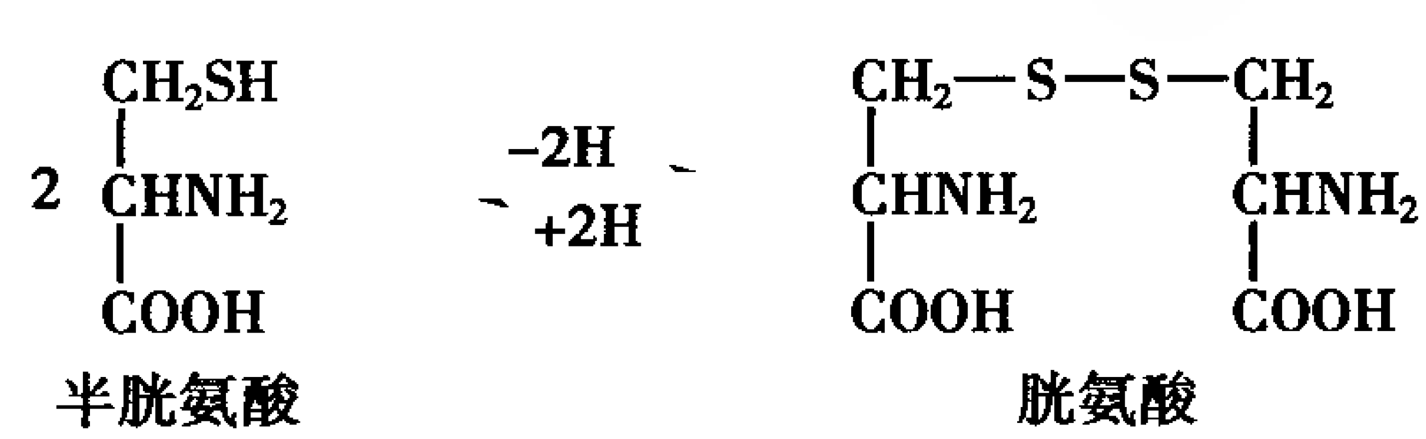
肌酸和磷酸肌酸的终末代谢产物是肌酸酐（creatinine）。肌酸酐主要在肌肉中通过磷酸肌酸的非酶促反应生成。肌酸、磷酸肌酸和肌酸酐的代谢见图7-13。肌酸酐随尿排出，正常人，每日尿中肌酸酐的排出量恒定。当肾功能障碍时，肌酸酐排出受阻，血中浓度升高。血中肌酸酐的测定有助于肾功能不全的诊断。



●图7-13 肌酸代谢

（二）半胱氨酸代谢可产生多种重要的生理活性物质

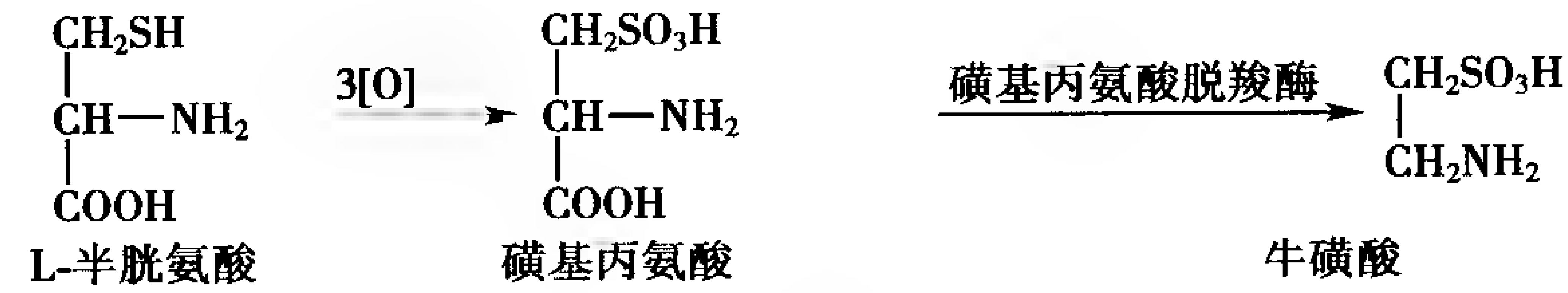
1. 半胱氨酸与胱氨酸可以互变 半胱氨酸与胱氨酸都属于非必需氨基酸，半胱氨酸含有巯基（—SH），胱氨酸含有二硫键（—S—S—），两者可以相互转变。



在许多蛋白质分子中，两个半胱氨酸残基间所形成的二硫键对于维持蛋白质空间构象的稳定性具有重要作用。如胰岛素的A、B链就是以二硫键连接的，如二硫键断裂，胰岛素即失去其生物活性。体内许多重要的酶，如琥珀酸脱氢酶、乳酸脱氢酶等的活性与半胱氨酸的巯基直接有关，故有巯基酶之称。有些毒物，如介子气、重金属盐等，能与酶分子中的巯基结合而抑制酶活性。体内存在的还原型谷胱甘肽能保护酶分子上的巯基，因而有重要的生理作用。

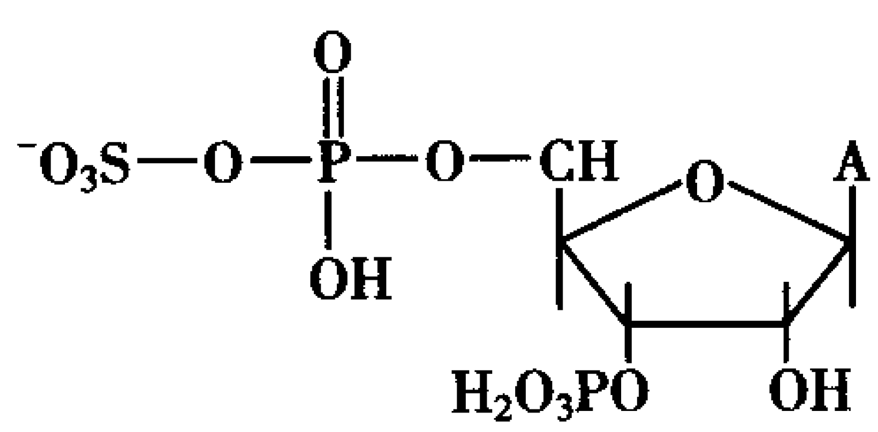
2. 半胱氨酸可转变成牛磺酸

半胱氨酸首先氧化成磺基丙氨酸，再经磺基丙氨酸脱羧酶催化，脱去羧基生成牛磺酸。牛磺酸是结合胆汁酸的组成成分之一。



3. 半胱氨酸可生成活性硫酸根　含硫氨基酸氧化分解均可产生硫酸根，但半胱氨酸是体内硫酸根的主要来源。半胱氨酸可以直接脱去巯基和氨基，生成丙酮酸、氨和 H_2S。H_2S 经氧化生成 H_2SO_4。体内的硫酸根，一部分以无机盐的形式随尿排出，另一部分由 ATP 活化生成活性硫酸根，即 3′-磷酸腺苷-5′-磷酸硫酸（3′-phospho-adenosine-5′-phospho-sulfate，PAPS），反应过程如下：

$$ATP + SO_4^{2-} \xrightarrow{-PPi} \underset{\text{腺苷-5'-磷酸硫酸}}{AMP—SO_3^-} \xrightarrow{+ATP} \underset{\text{PAPS}}{3'—PO_3H_2—AMP—SO_3^-} + ADP$$



PAPS的结构

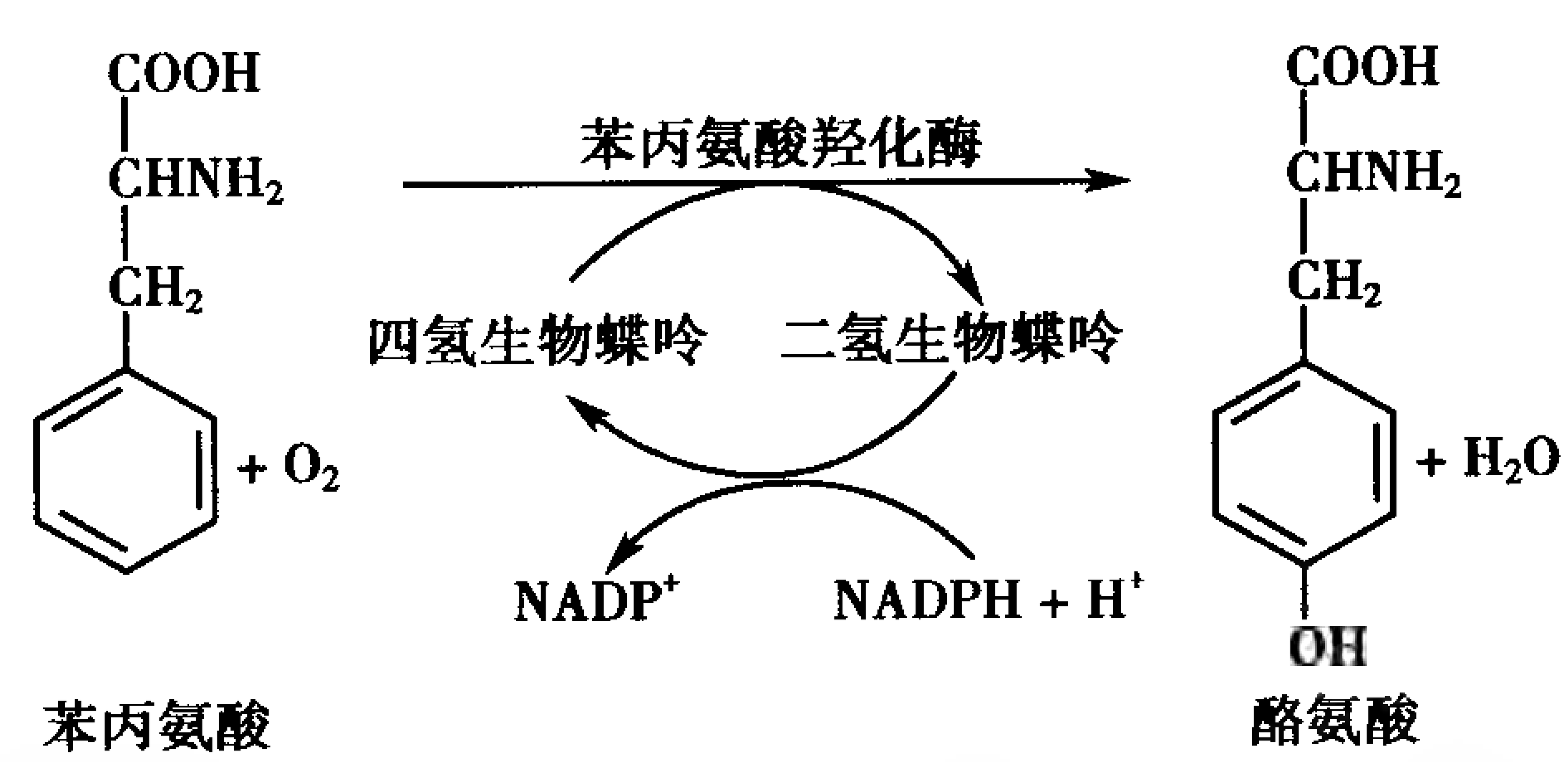
PAPS 化学性质活泼，在肝生物转化中可提供硫酸根使某些物质生成硫酸酯。例如，类固醇激素可形成硫酸酯而被灭活，一些外源性酚类化合物也可以形成硫酸酯而排出体外。此外，PAPS 还可参与硫酸角质素及硫酸软骨素等分子中硫酸化氨基糖的合成。

四、芳香族氨基酸代谢可产生神经递质

芳香族氨基酸包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。酪氨酸可由苯丙氨酸羟化生成。苯丙氨酸与色氨酸为营养必需氨基酸。

（一）苯丙氨酸和酪氨酸代谢既有联系又有区别

1. 苯丙氨酸羟化生成酪氨酸　正常情况下，苯丙氨酸的主要代谢是经羟化作用，生成酪氨酸，反应由苯丙氨酸羟化酶（phenylalanine hydroxylase）催化。苯丙氨酸羟化酶主要存在于肝等组织，属一种单加氧酶，辅酶是四氢生物蝶呤，催化的反应不可逆，故酪氨酸不能转变为苯丙氨酸。



苯丙氨酸除能转变为酪氨酸外，少量可经转氨基作用生成苯丙酮酸。先天性苯丙氨酸羟化酶缺陷患者，不能将苯丙氨酸羟化为酪氨酸，苯丙氨酸经转氨基作用大量生成苯丙酮酸。大量的苯丙酮酸及其部分代谢产物（苯乳酸及苯乙酸等）由尿排出，称为苯丙酮酸尿症（phenylketonuria，PKU）。苯丙酮酸的堆积对中枢神经系统有毒性，使脑发育障碍，患儿智力低下。治疗原则是早期发现，并适当控制膳食中苯丙氨酸的含量。

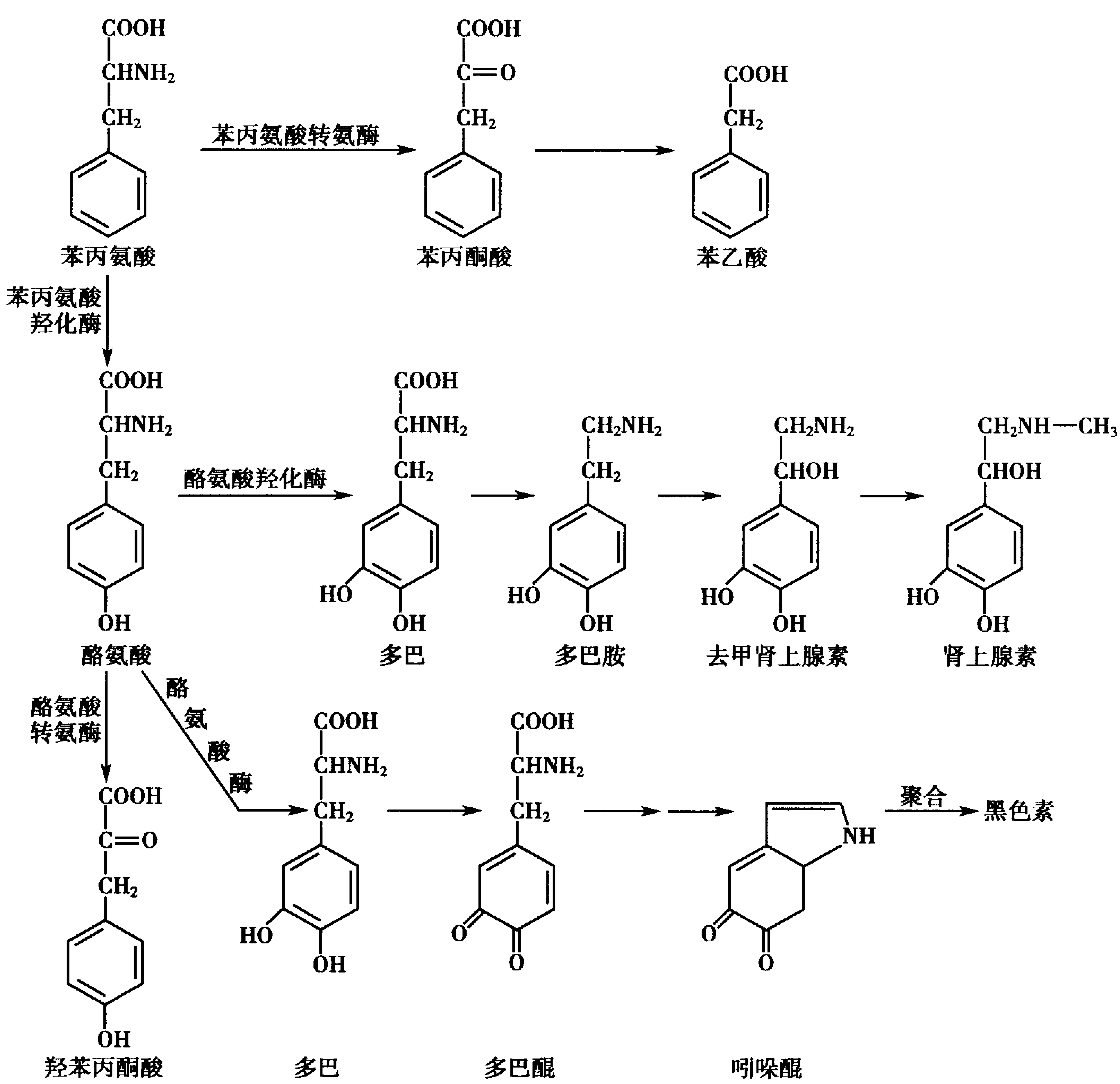
2. 酪氨酸转变为儿茶酚胺和黑色素或彻底氧化分解　酪氨酸的进一步代谢与合成某

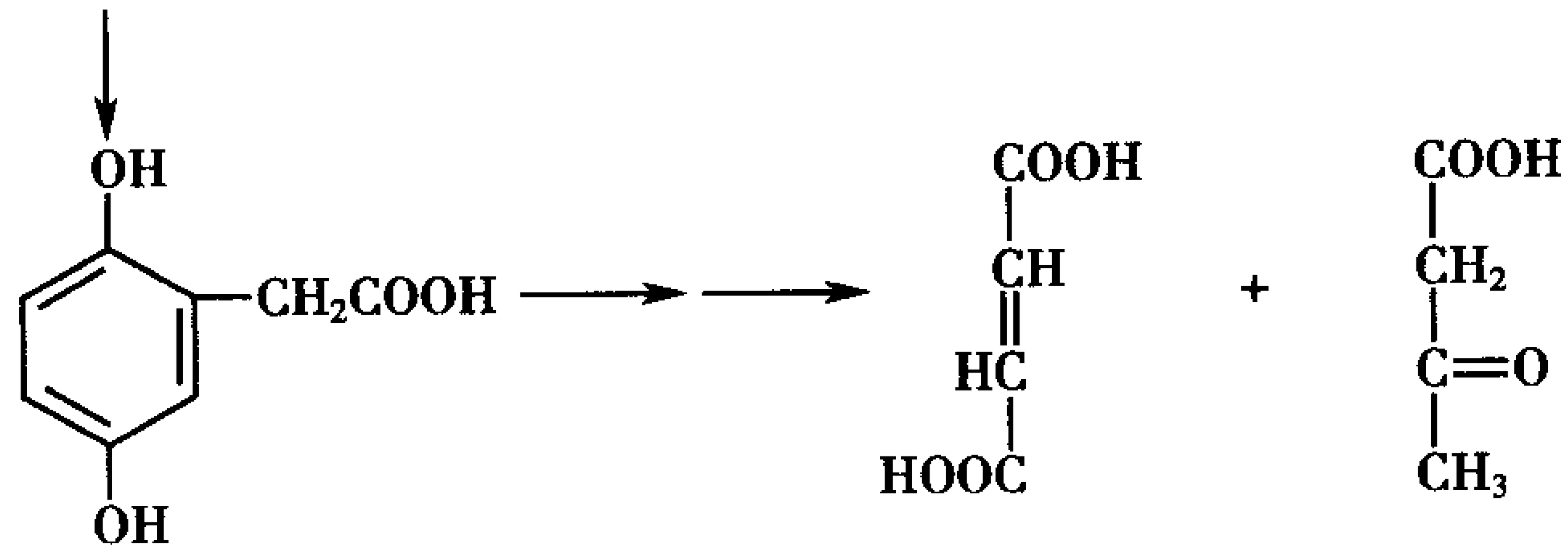
些神经递质、激素及黑色素有关。酪氨酸在肾上腺髓质和神经组织经酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase）催化生成 3，4-二羟苯丙氨酸（3，4-dihy droxy-phenyl-alanine，DOPA，多巴）。与苯丙氨酸羟化酶相似，酪氨酸羟化酶也是以四氢生物蝶呤为辅酶的单加氧酶。在多巴脱羧酶的作用下，多巴脱去羧基生成多巴胺（dopamine）。多巴胺是一种神经递质。帕金森病（Parkinson's disease）患者多巴胺生成减少。在肾上腺髓质，多巴胺侧链的β-碳原子再被羟化，生成去甲肾上腺素（norepinephrine），后者甲基化生成肾上腺素（epinephrine）。多巴胺、去甲肾上腺素及肾上腺素统称为儿茶酚胺（catecholamine）。酪氨酸羟化酶是合成儿茶酚胺的限速酶，受终产物的反馈调节。

酪氨酸代谢的另一条途径是合成黑色素（melanin）。在黑色素细胞中，酪氨酸经酪氨酸酶（tyrosinase）作用，羟化生成多巴，后者经氧化、脱羧等反应转变成吲哚醌，最后吲哚醌聚合为黑色素。先天性酪氨酸酶缺乏的病人，因不能合成黑色素，患者皮肤毛发等发白，称为白化病（albinism）。患者对阳光敏感，易患皮肤癌。

除上述代谢途径外，酪氨酸还可在酪氨酸转氨酶的催化下，生成对-羟苯丙酮酸，后者经尿黑酸等中间产物进一步转变成延胡索酸和乙酰乙酸，然后两者分别沿糖和脂肪酸代谢途径进行代谢。因此，苯丙氨酸和酪氨酸是生糖兼生酮氨基酸。当体内尿黑酸分解代谢的酶先天性缺陷时，尿黑酸的分解受阻，可出现尿黑酸尿症（alkaptonuria）。

苯丙氨酸和酪氨酸的代谢过程总结如下：





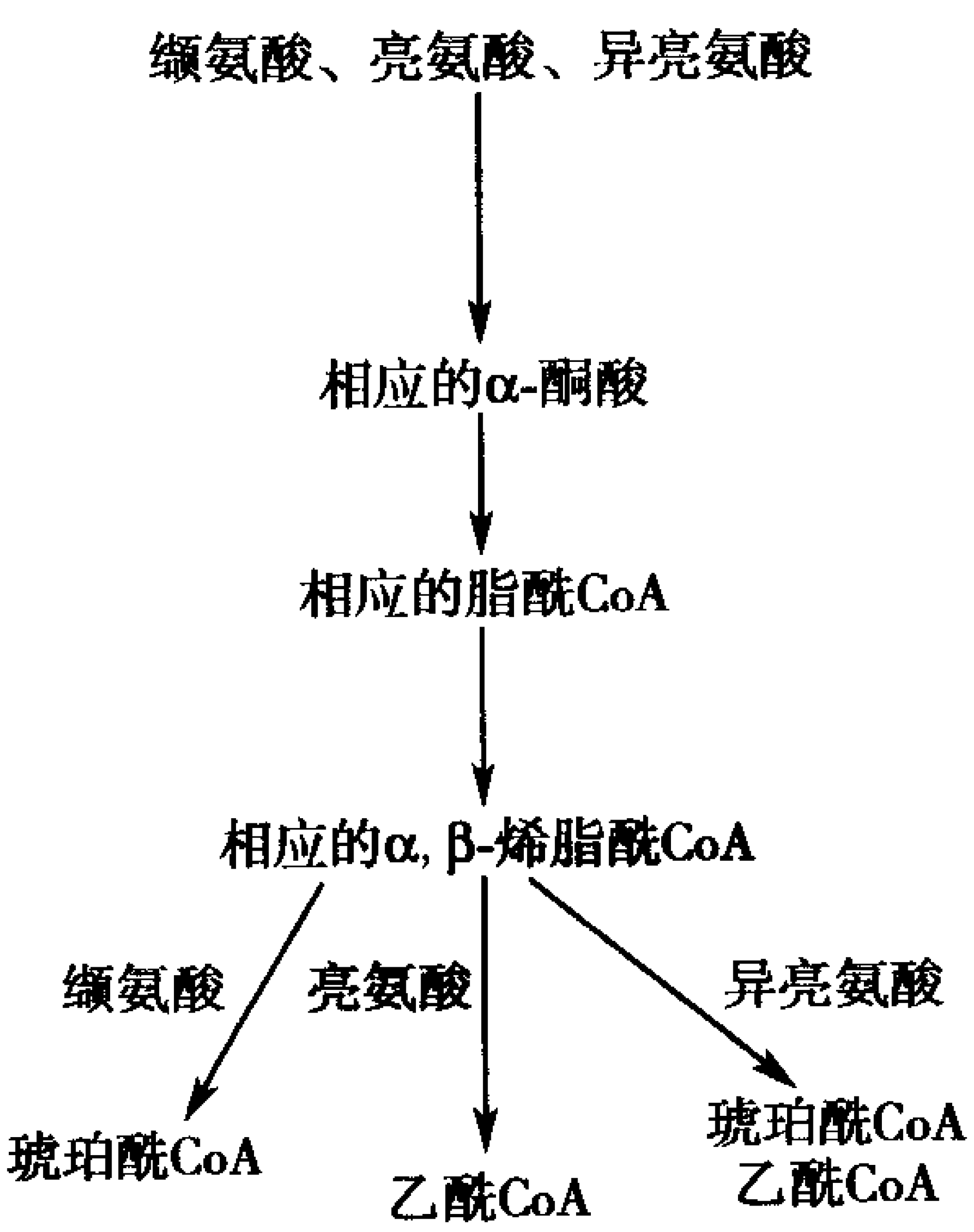
尿黑酸　　延胡索酸　　乙酰乙酸

(二) 色氨酸的分解代谢可产生丙酮酸和乙酰乙酰 CoA

色氨酸除生成 5-羟色胺外，在肝中色氨酸经色氨酸加氧酶（tryptophan oxygenase）催化开环，生成一碳单位和多种酸性中间代谢产物。色氨酸分解可产生丙酮酸和乙酰乙酰 CoA，故色氨酸为生糖兼生酮氨基酸。少部分色氨酸还可转变成烟酸，但合成量很少，不能满足机体的需要。

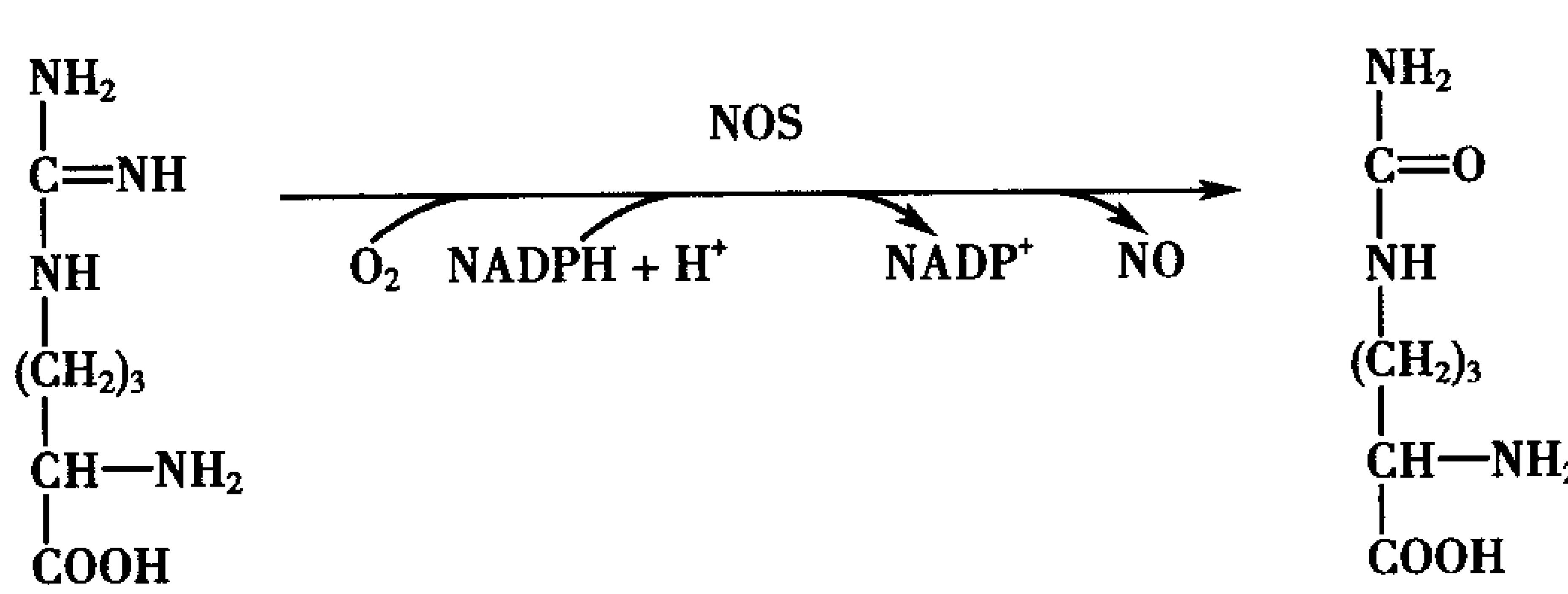
五、支链氨基酸的分解有相似的代谢过程

支链氨基酸包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸，它们都是营养必需氨基酸，在体内的分解有相似的代谢过程，大致分为三个阶段：(1) 通过转氨基作用生成相应的 α-酮酸；(2) 通过氧化脱羧生成相应的脂酰 CoA；(3) 通过脂酸 β-氧化过程，生成不同的中间产物参与三羧酸循环，其中缬氨酸分解产生琥珀酰 CoA，亮氨酸产生乙酰 CoA 和乙酰乙酰 CoA，异亮氨酸产生琥珀酰 CoA 和乙酰 CoA。所以，这三种氨基酸分别是生糖氨基酸，生酮氨基酸和生糖兼酮氨基酸。支链氨基酸的分解代谢主要在骨骼肌中进行（图 7-14）。



●图 7-14　支链氨基酸的分解代谢

综上所述，氨基酸除了作为合成蛋白质的原料外，还可以转变为神经递质、激素及其他重要的含氮生理活性物质（表 7-3）。值得提出的是，其中一氧化氮（NO）的细胞信号转导功能研究近年来受到高度关注，而体内 NO 正是由精氨酸经一氧化氮合酶（nitric oxide synthase，NOS）催化生成的，反应如下：



精氨酸　　瓜氨酸

表 7-3　氨基酸衍生的重要含氮化合物

氨基酸	衍生的化合物	生理功用
天冬氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸	嘌呤碱	含氮碱基、核酸成分
天冬氨酸	嘧啶碱	含氮碱基、核酸成分
甘氨酸	卟啉化合物	细胞色素、血红素
苯丙氨酸、酪氨酸	儿茶酚胺、甲状腺素	神经递质、激素
色氨酸	5-羟色胺、尼克酸	神经递质、维生素
谷氨酸	γ-氨基丁酸	神经递质
甲硫氨酸、鸟氨酸	精脒、精胺	细胞增殖促进剂
组氨酸	组胺	血管舒张剂
半胱氨酸	牛磺酸	结合胆汁酸成分
苯丙氨酸、酪氨酸	黑色素	皮肤色素
甘氨酸、精氨酸、甲硫氨酸	肌酸、磷酸肌酸	能量储存
精氨酸	一氧化氮（NO）	细胞信息转导分子

小　　结

氨基酸具有重要的生理功能，除作为合成蛋白质的原料外，还可转变成某些激素、神经递质及核苷酸等含氮物质。人体的氨基酸主要来自食物蛋白质的消化吸收。各种蛋白质由于所含氨基酸的种类和数量不同，其营养价值也不同。体内不能合成而必须由食物提供的氨基酸称为营养必需氨基酸，人体的营养必需氨基酸有 8 种。食物蛋白质的消化主要在小肠进行，由各种蛋白水解酶协同完成。水解生成的氨基酸通过载体蛋白和 γ-谷氨酰基循环吸收。未被消化的蛋白质和未被吸收的氨基酸在大肠下部发生腐败作用。体内有两条蛋白质降解途径：一条是非依赖 ATP 的溶酶体蛋白水解酶降解途径；另一条是胞质内的依赖 ATP 和泛素的蛋白酶体降解途径。外源性与内源性的氨基酸共同构成“氨基酸代谢库”，参与体内代谢。

氨基酸的脱氨基作用生成氨及相应的 α-酮酸，这是氨基酸的主要分解途径。在转氨酶的作用下，α-氨基酸的氨基转移至 α-酮戊二酸，生成 *L*-谷氨酸。在 *L*-谷氨酸脱氢酶的催化下，*L*-谷氨酸进行氧化脱氨基作用，生成氨和 α-酮戊二酸。此途径是体内大多数氨基酸脱氨基的主要方式。由于该过程可逆，因此也是体内合成营养非必需氨基酸的重要途径。在骨骼肌等组织，氨基酸主要通过嘌呤核苷酸循环脱去氨基。

α-酮酸是氨基酸的碳架，部分可用于合成氨基酸，其余有些可转变成丙酮酸和三羧酸循环的中间产物而生成糖，有些可转变成乙酰 CoA 而生成脂类。由此可见，在体内氨基酸、糖及脂类代谢有着广泛的联系。

氨是有毒物质。体内的氨以丙氨酸和谷氨酰胺的形式运往肝，大部分经鸟氨酸循环生成尿素排出体外。鸟氨酸循环受多种因素的调节。肝功能严重受损时，可产生高血氨症和肝性脑病。体内少部分氨在肾以铵盐形式随尿排出。

胺类物质也具有重要的生理作用，如 γ-氨基丁酸、组胺、5-羟色胺、牛磺酸及多胺等。它们都是氨基酸脱羧基的产物，故脱羧基作用也是氨基酸的重要代谢途径。

某些氨基酸在分解代谢过程中可产生含有一个碳原子的基团，称为一碳单位，例如甲

基、甲烯基、甲炔基、甲酰基及亚氨甲基等。四氢叶酸是一碳单位的运载体，在其代谢过程中起着重要的作用。一碳单位的主要功用是用于嘌呤和嘧啶核苷酸的合成。

含硫氨基酸有甲硫氨酸、半胱氨酸和胱氨酸。甲硫氨酸的主要功能是通过甲硫氨酸循环，提供活性甲基。此外，还可参与肌酸等代谢。半胱氨酸与胱氨酸可以相互转变，半胱氨酸可转变成牛磺酸，后者是结合胆汁酸的组成成分。许多重要酶的活性与酶蛋白分子中半胱氨酸的自由巯基有关。含硫氨基酸分子中的硫在体内最后可转变成 H_2SO_4，部分以钠盐形式随尿排出，其余转变成活性硫酸根（PAPS）。

芳香族氨基酸包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。苯丙氨酸羟化生成酪氨酸，后者转变成儿茶酚胺和黑色素。苯丙酮酸尿症及白化病等遗传病与苯丙氨酸或酪氨酸的代谢异常有关。

（程牛亮　周爱儒）

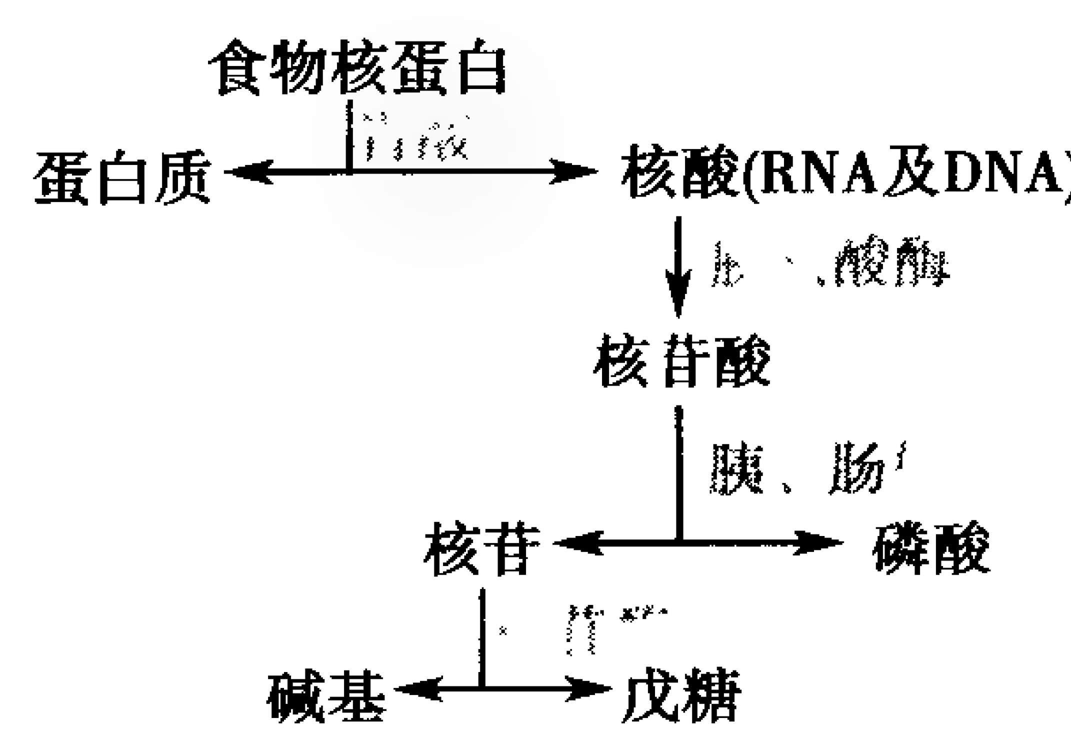
第八章 核苷酸代谢

核酸分解的研究历史与抗代谢药物

1909～1934 年，美国生物化学家 Owen 证明，核酸的分解单位是核苷酸。1936 年，Ponnamperuma 在实验中得到了腺嘌呤。后来，又与 R. Mariner、C. Sagan 将腺嘌呤与核糖连接成为腺苷；再连接磷酸，得到了腺苷三磷酸（ATP）。生物化学家发现动物会排泄 3 种不同的含氮废物，即 NH_3、尿素和尿酸。尿酸就是嘌呤化合物的代谢产物。在 1950 年，J. M. Buchanan 和 G. R. Greenberg 采用同位素示踪结合嘌呤核苷酸降解物——尿酸分析证明，嘌呤分子的原子 N_1 来自天冬氨酸，N_3 和 N_9 来自谷氨酰胺等，完成了嘌呤生物合成过程的演绎。1964 年，科学家确定 Lesch-Nyhan 综合征与次黄嘌呤一鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（HGPRT）缺陷有关。至今已发现，核苷酸的合成和分解代谢障碍与很多遗传性、代谢性疾病有关。模拟核苷酸组成成分，如取代碱基、核苷和核苷酸的类似物已发展为临床上常用的抗代谢药物。

核苷酸是核酸的基本结构单位。人体内的核苷酸主要由机体细胞自身合成。因此与氨基酸不同，核苷酸不属于营养必需物质。

食物中的核酸多以核蛋白的形式存在。核蛋白在胃中受胃酸的作用，分解成核酸与蛋白质。核酸进入小肠后，受胰液和肠液中各种水解酶的作用逐步水解（图 8-1）。核苷酸及其水解产物均可被细胞吸收，但它们的绝大部分在肠黏膜细胞中又被进一步分解。分解产生的戊糖被吸收而参加体内的戊糖代谢；嘌呤和嘧啶碱则主要被分解而排出体外。因此，食物来源的嘌呤和嘧啶碱很少被机体利用。



● 图 8-1 核酸的消化

核苷酸在体内分布广泛。细胞中主要以 5′-核苷酸形式存在，其中又以 5′-ATP 含量最多。一般说来，细胞中核糖核苷酸的浓度远远超过脱氧核糖核苷酸，前者约在 mmol 范围，而后者只在 μmol 水平。在细胞分裂周期中，细胞内脱氧核糖核苷酸含量波动范围较大，核糖核苷酸浓度则相对稳定。不同类型细胞中各种核苷酸含量差异很大。同一种细胞中，各种核苷酸含量虽也有差异，但核苷酸总含量变化不大。

核苷酸具有多种生物学功用：①作为核酸合成的原料，这是核苷酸最主要的功能。②体内能量的利用形式。ATP 是细胞的主要能量形式。此外 GTP 也可以提供能量。③参与代谢和生理调节。某些核苷酸或其衍生物是重要的调节分子。例如 cAMP 是多种细胞膜受体激素作用的第二信使；cGMP 也与代谢调节有关。④组成辅酶。例如腺苷酸可作为多种辅酶（NAD、FAD、辅酶 A 等）的组成成分。⑤活化中间代谢物。核苷酸可以作为多种活化中间代谢物的载体。例如 UDP 葡萄糖是合成糖原、糖蛋白的活性原料，CDP 二酰基甘油是合成磷脂的活性原料，S 腺苷甲硫氨酸是活性甲基的载体等。ATP 还可作为蛋白激酶反应中磷酸基团的供体。

本章重点讨论核苷酸在体内的合成过程。

第一节　嘌呤核苷酸的合成与分解代谢

一、嘌呤核苷酸的合成存在从头合成和补救合成两种途径

体内嘌呤核苷酸的合成有两条途径。

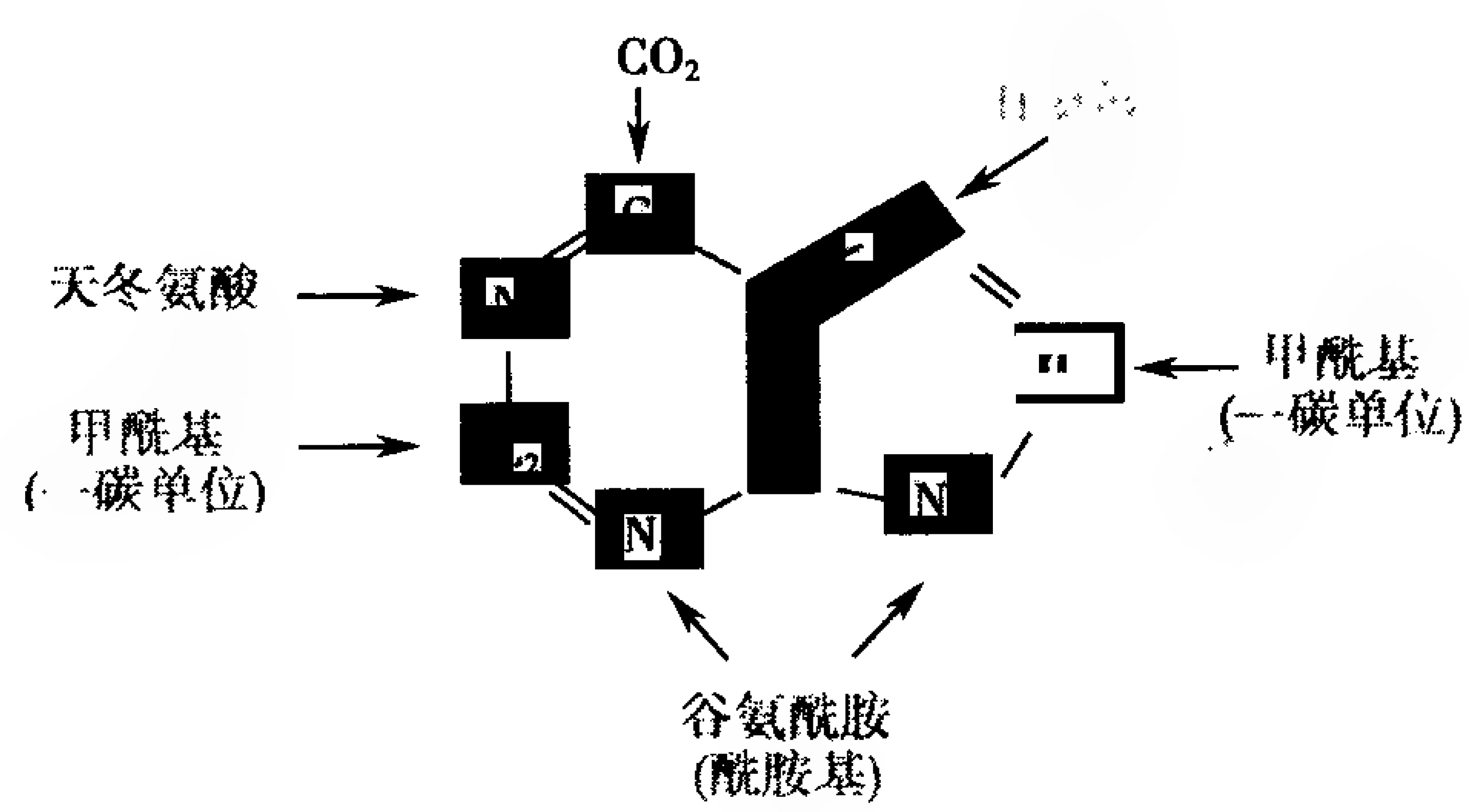
第一，利用磷酸核糖、氨基酸、一碳单位及 CO_2 等简单物质为原料，经过一系列酶促反应，合成嘌呤核苷酸，称为从头合成途径（de novo synthesis）。

第二，利用体内游离的嘌呤或嘌呤核苷，经过简单的反应过程，合成嘌呤核苷酸，称为补救合成（或重新利用）途径（salvage pathway）。两者在不同组织中的重要性各不相同，例如肝组织进行从头合成途径，而脑、骨髓等则进行补救合成。一般情况下，前者是合成的主要途径。

（一）嘌呤核苷酸的从头合成

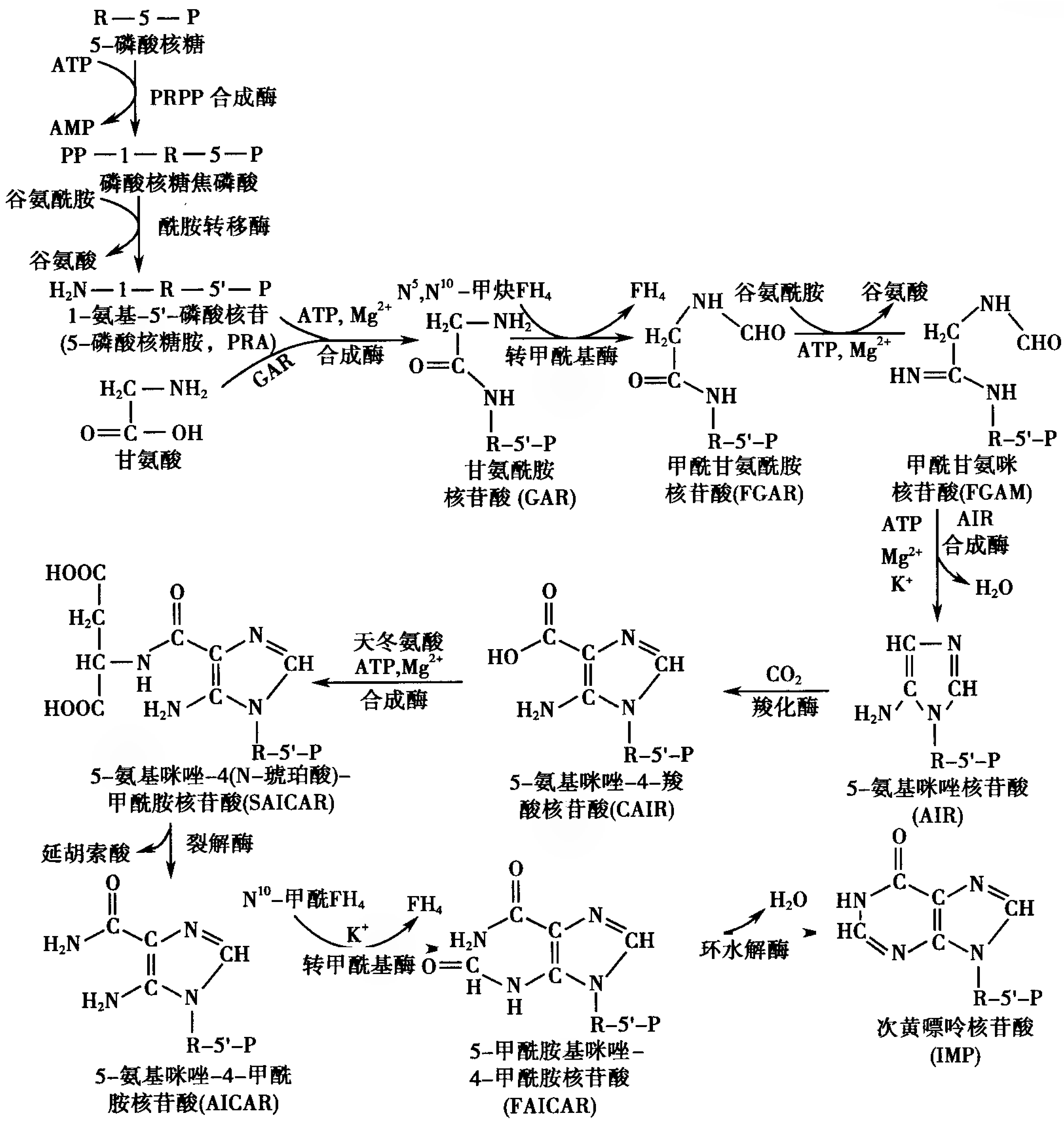
1. 从头合成途径除某些细菌外，几乎所有生物体都能合成嘌呤碱。同位素示踪实验证明，嘌呤碱的前身物均为简单物质。

图 8-2 表示嘌呤环合成的各元素来源，例如氨基酸、CO_2 及甲酰基（来自四氢叶酸）等。嘌呤核苷酸的从头合成在胞液中进行。反应步骤比较复杂，可分为两个阶段：首先合成次黄嘌呤核苷酸（inosine monophosphate，IMP），然后 IMP 再转变成腺嘌呤核苷酸（adenosine monophosphate，AMP）与鸟嘌呤核苷酸（guanosine monophosphate，GMP）。



● 图 8-2　嘌呤碱合成的元素来源

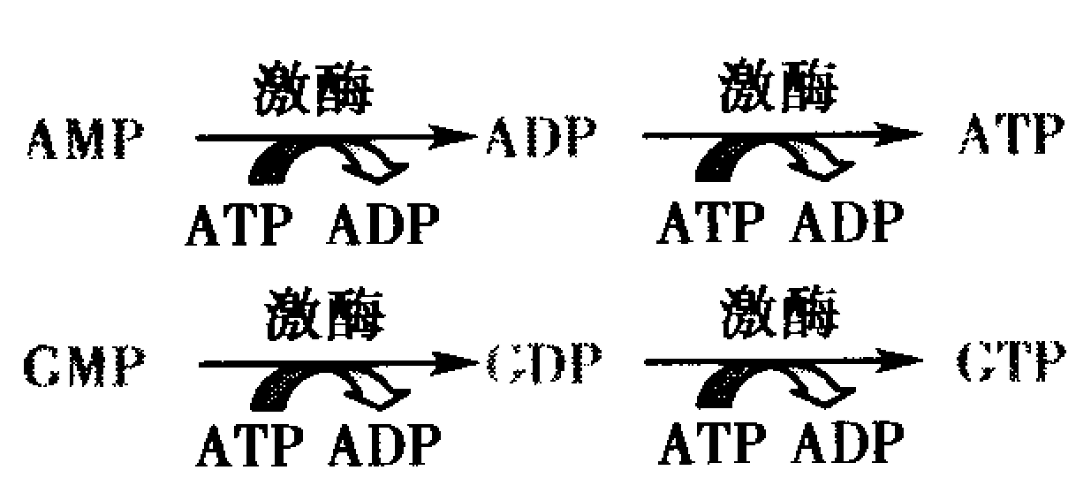
（1）IMP 的合成：IMP 的合成经过十一步反应完成（图 8-3）。①5-磷酸核糖（磷酸戊糖途径中产生）经过磷酸核糖焦磷酸合成酶作用，活化生成磷酸核糖焦磷酸（phosphoribosyl pyrophosphate，PRPP）。②谷氨酰胺提供酰胺基取代 PRPP 上的焦磷酸，形成 5-磷酸核糖胺（PRA），此反应由磷酸核糖酰胺转移酶（amidotransferase）催化。PRA 极不稳定，$t_{1/2}$为 30 秒。③由 ATP 供能，甘氨酸与 PRA 加合，生成甘氨酰胺核苷酸（GAR）。④N^5，N^{10}-甲炔四氢叶酸供给甲酰基，使 GAR 甲酰化，生成甲酰甘氨酰胺核苷酸（FGAR）。⑤谷氨酰胺提供酰胺氮，使 FGAR 生成甲酰甘氨咪核苷酸（FGAM），此反应消耗 1 分子 ATP。⑥FGAM 脱水环化形成 5-氨基咪唑核苷酸（AIR），此反应也需要 ATP 参与。至此，合成了嘌呤环中的咪唑环部分。⑦CO_2 连接到咪唑环上，作为嘌呤碱中 C_6 的来源，生成 5-氨基咪唑，4-羧酸核苷酸（CAIR）。⑧及⑨在 ATP 存在下，天冬氨酸与 CAIR 缩合，生成产物再脱去 1 分子延胡索酸而裂解为 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸（AICAR）。⑩N^{10}-甲酰四氢叶酸提供一碳单位，使 AICAR 甲酰化，生成 5-甲酰胺基咪唑-4-甲酰胺核苷酸（FAICAR）。⑪ FAICAR 脱水环化，生成 IMP（图 8-3）。嘌呤核苷酸从头合



●图 8-3　次黄嘌呤核苷酸的合成

成的酶在胞液中多以酶复合体形式存在。

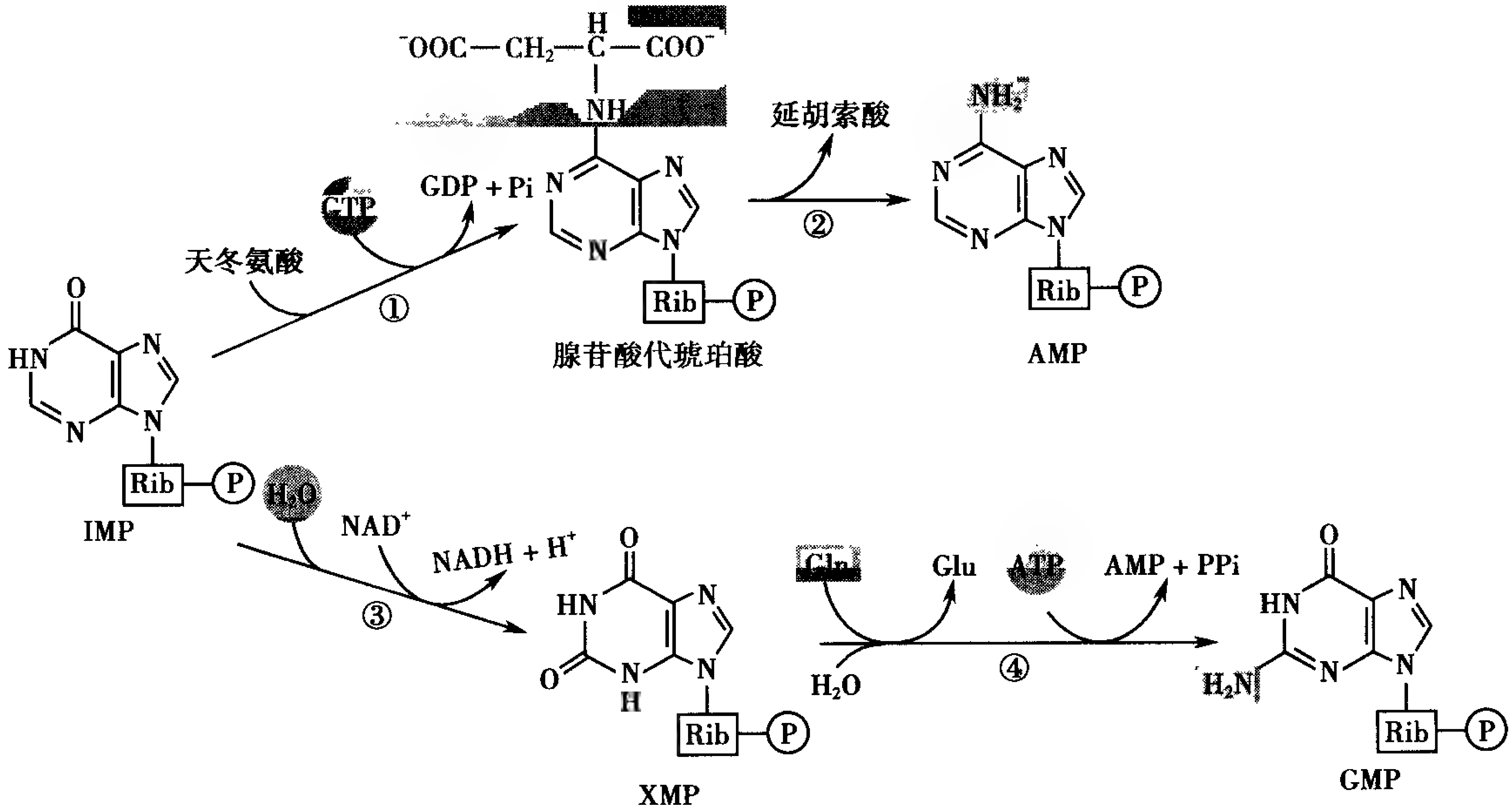
（2）AMP 和 GMP 的生成：IMP 虽然不是核酸分子的主要组成成分，但它是嘌呤核苷酸合成的重要中间产物，IMP 可以分别转变成 AMP 和 GMP（图 8-4）。AMP 和 GMP 在激酶作用下，经过两步磷酸化反应，进一步分别生成 ATP 和 GTP。



由上述反应过程可以清楚地看到，嘌呤核苷酸是在磷酸核糖分子上逐步合成嘌呤环的，而不是首先单独合成嘌呤碱然后再与磷酸核糖结合的。这与嘧啶核苷酸的合成过程不同，是嘌呤核苷酸从头合成的一个重要特点。

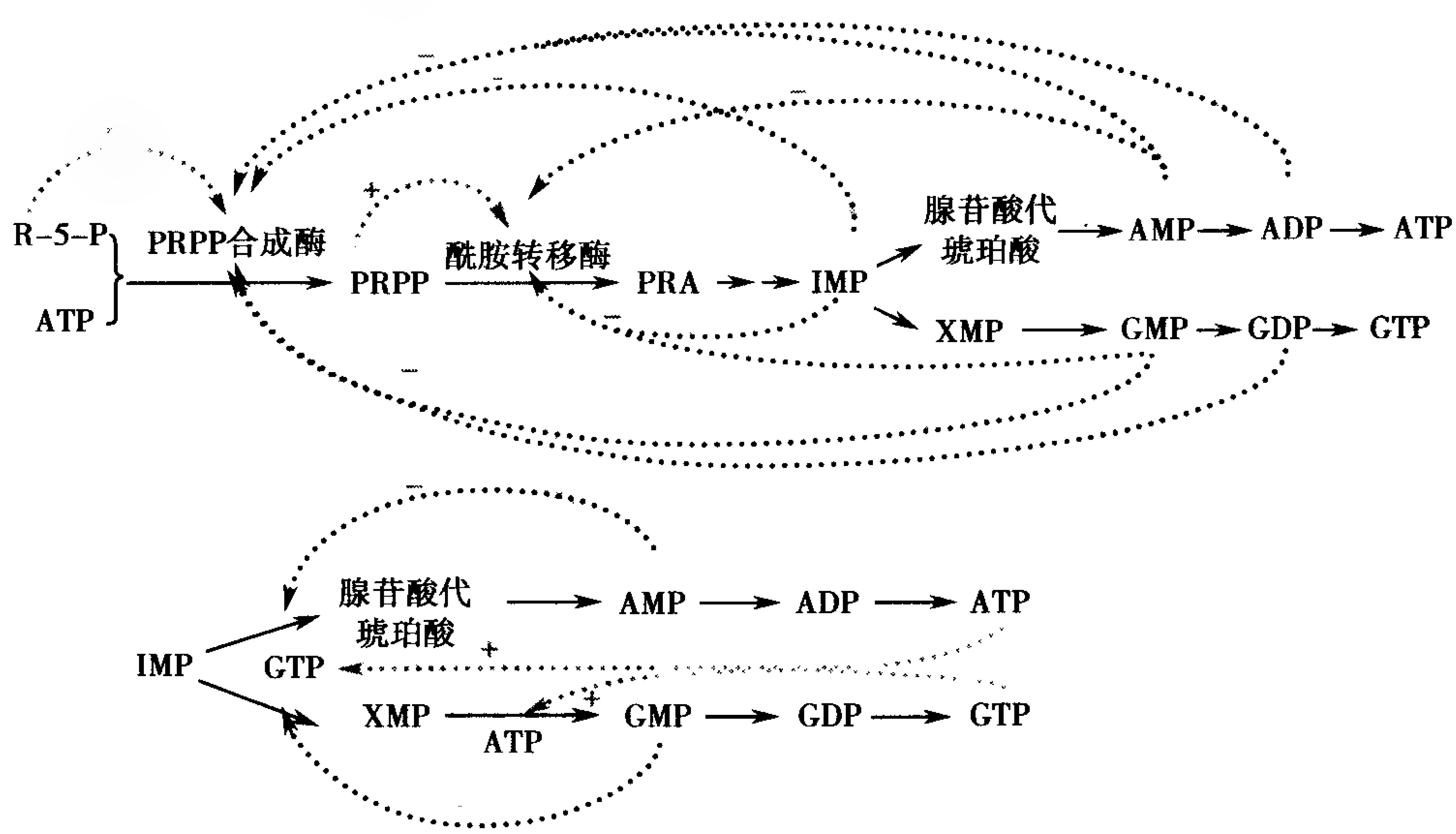
肝是体内从头合成嘌呤核苷酸的主要器官，其次是小肠黏膜及胸腺。现已证明，并不

是所有的细胞都具有从头合成嘌呤核苷酸的能力。



●图 8-4　由 IMP 合成 AMP 及 GMP

2. 从头合成的调节　嘌呤核苷酸的从头合成是体内提供核苷酸的主要来源，但这个过程需要消耗氨基酸等原料及大量 ATP。机体对其合成速度进行着精确的调节，一方面以满足合成核酸对嘌呤核苷酸的需要，同时又不会“供过于求”，以节省营养物及能量的消耗。调节的机制是反馈调节，主要发生在下列几个部位（图 8-5）。



●图 8-5　嘌呤核苷酸从头合成的调节
（+表示促进；−表示抑制）

嘌呤核苷酸合成起始阶段的 PRPP 合成酶和 PRPP 酰胺转移酶均可被合成产物 IMP、

AMP 及 GMP 等抑制。反之，PRPP 增加可以促进酰胺转移酶活性，加速 PRA 生成。PRPP 酰胺转移酶是一类变构酶，其单体形式有活性，二聚体形式无活性。IMP、AMP 及 GMP 使活性形式转变成无活性形式，而 PRPP 则相反。在嘌呤核苷酸合成调节中，PRPP 合成酶可能比酰胺转移酶起着更大的作用。此外，在形成 AMP 和 GMP 过程中，过量的 AMP 控制 AMP 的生成，而不影响 GMP 的合成；同样，过量的 GMP 控制 GMP 的生成，而不影响 AMP 的合成。从图 8-5 还可看出，IMP 转变成 AMP 时需要 GTP，而 IMP 转变成 GMP 时需要 ATP。由此可见，GTP 可以促进 AMP 的生成，ATP 也可以促进 GMP 的生成。这种交叉调节作用对维持 ATP 与 GTP 浓度的平衡具有重要意义。

（二）嘌呤核苷酸的补救合成有两种方式

细胞利用现成嘌呤碱或嘌呤核苷重新合成嘌呤核苷酸，称为补救合成。补救合成过程比较简单，消耗能量也少。有两种酶参与嘌呤核苷酸的补救合成：腺嘌呤磷酸核糖转移酶（adenine phosphoribosyl transferase，APRT）和次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase，HGPRT）。由 PRPP 提供磷酸核糖，它们分别催化 AMP 和 IMP、GMP 的补救合成。

$$\text{腺嘌呤} + \text{PRPP} \xrightarrow{\text{APRT}} \text{AMP} + \text{PPi}$$

$$\text{次黄嘌呤} + \text{PRPP} \xrightarrow{\text{HGPRT}} \text{IMP} + \text{PPi}$$

$$\text{鸟嘌呤} + \text{PRPP} \xrightarrow{\text{HGPRT}} \text{GMP} + \text{PPi}$$

APRT 受 AMP 的反馈抑制，HGPRT 受 IMP 与 GMP 的反馈抑制。

人体内嘌呤核苷的重新利用通过腺苷激酶催化的磷酸化反应，使腺嘌呤核苷生成腺嘌呤核苷酸。

$$\text{腺嘌呤核苷} \xrightarrow[\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}]{\text{腺苷激酶}} \text{AMP}$$

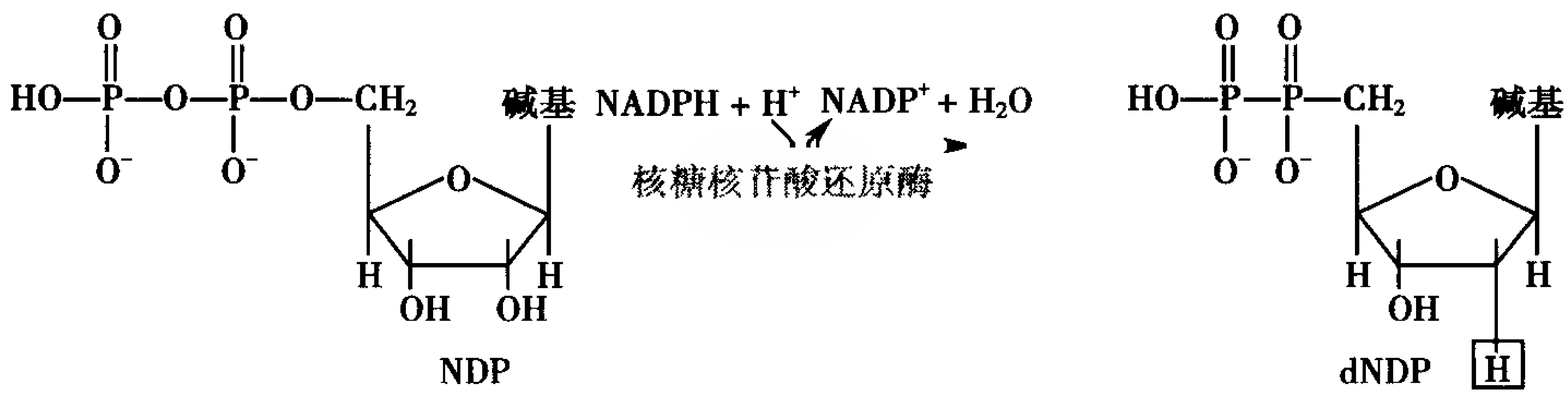
嘌呤核苷酸补救合成的生理意义一方面在于可以节省从头合成时能量和一些氨基酸的消耗；另一方面，体内某些组织器官，例如脑、骨髓等由于缺乏从头合成嘌呤核苷酸的酶体系，它们只能进行嘌呤核苷酸的补救合成。因此，对这些组织器官来说，补救合成途径具有更重要的意义。例如，由于基因缺陷而导致 HGPRT 完全缺失的患儿，表现为自毁容貌征或称 Lesch-Nyhan 综合征，这是一种遗传代谢病。

（三）体内嘌呤核苷酸可以相互转变

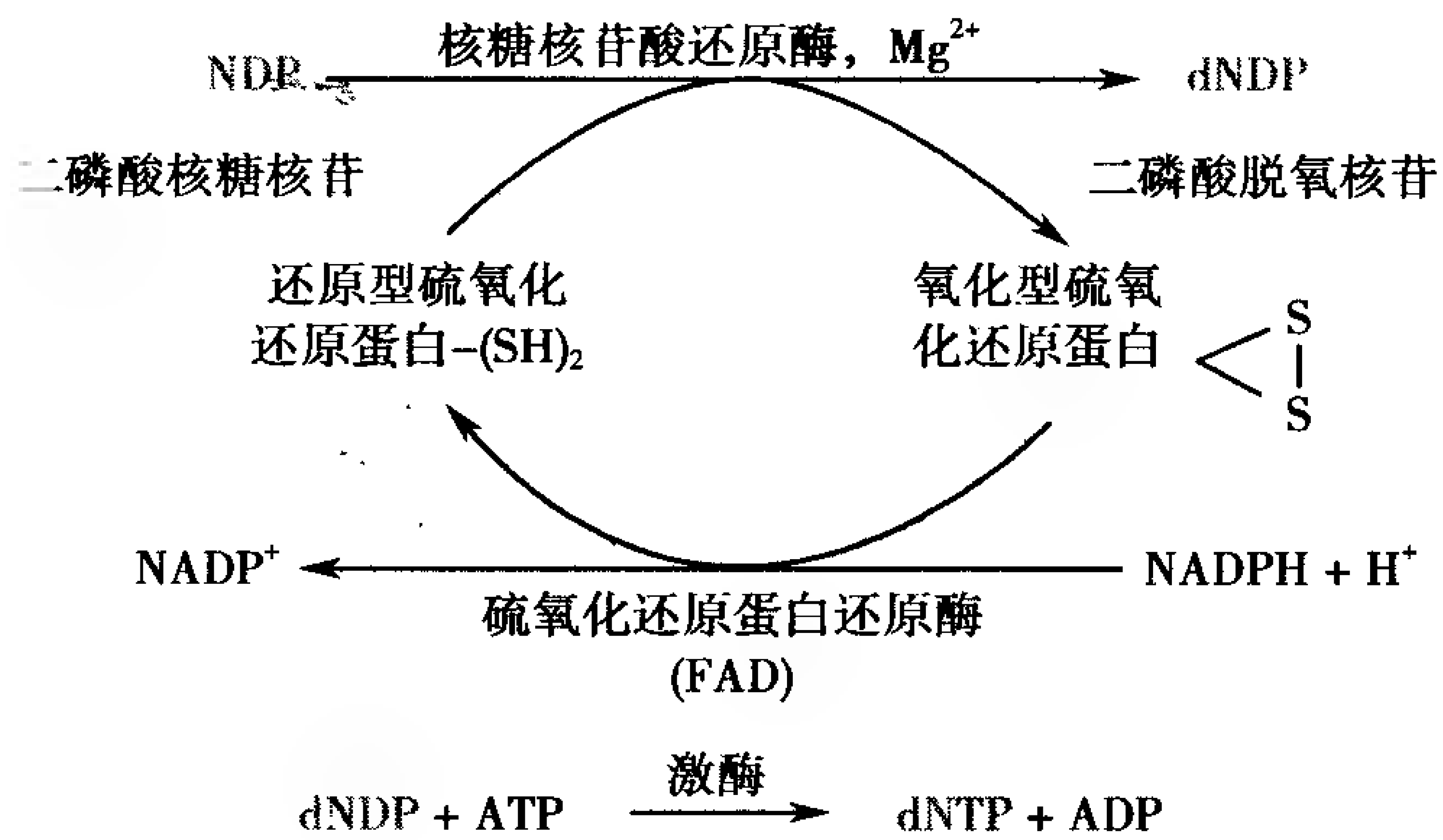
体内嘌呤核苷酸可以相互转变，以保持彼此平衡。前已述及 IMP 可以转变成 XMP、AMP 及 GMP。其实，AMP、GMP 也可以转变成 IMP。由此，AMP 和 GMP 之间也是可以相互转变的。

（四）脱氧（核糖）核苷酸的生成在二磷酸核苷水平进行

以上讨论的是嘌呤核苷酸的合成过程。DNA 由各种脱氧核苷酸组成。细胞分裂旺盛时，脱氧核苷酸含量明显增加，以适应合成 DNA 的需要。脱氧核苷酸，包括嘌呤脱氧核苷酸和嘧啶脱氧核苷酸从何而来？现已证明，体内脱氧核苷酸中所含的脱氧核糖并非先形成后再结合到其分子上，而是通过相应的核糖核苷酸的直接还原作用，以氢取代其核糖分子中 C_2 上的羟基而生成的。这种还原作用基本上在二磷酸核苷（NDP）水平上进行（在这里 N 代表 A、G、U、C 等碱基），由核糖核苷酸还原酶（ribonucleotide reductase）催化。反应如下：



其实，这一反应的过程比较复杂（图 8-6）。核糖核苷酸还原酶从 NADPH 获得电子时，需要一种硫氧化还原蛋白（thioredoxin）作为电子载体，硫氧化还原蛋白的分子量约为 12000，其所含的巯基在核糖核苷酸还原酶作用下氧化为二硫键。后者再经另一种称为硫氧化还原蛋白还原酶（thioredoxin reductase）的催化，重新生成还原型的硫氧化还原蛋白，由此构成一个复杂的酶体系。核糖核苷酸还原酶是一种变构酶，包括 R_1、R_2 两个亚基，只有 R_1 与 R_2 结合时才具有酶活性。在 DNA 合成旺盛、分裂速度较快的细胞中，核糖核苷酸还原酶体系活性较强。



●图 8-6　脱氧核苷酸的生成

细胞除了控制还原酶的活性以调节脱氧核苷酸的浓度之外，还可以通过各种三磷酸核苷对还原酶的变构作用来调节不同脱氧核苷酸生成。因为某一种 NDP 被还原酶还原成 dNDP 时，需要特定 NTP 的促进，同时也受另一些 NTP 的抑制（表 8-1）。通过这样的调节，使合成 DNA 的 4 种脱氧核苷酸控制在适当的比例。

表 8-1　核糖核苷酸还原酶的变构调节

作用物	主要促进剂	主要抑制剂
CDP	ATP	dATP、dGTP、dTTP
UDP	ATP	dATP、dGTP
ADP	dGTP	dATP、ATP
GDP	dTTP	dATP

如上所述，与嘌呤脱氧核苷酸的生成一样，嘧啶脱氧核苷酸（dUDP、dCDP）也是通过相应的二磷酸嘧啶核苷的直接还原而生成的。

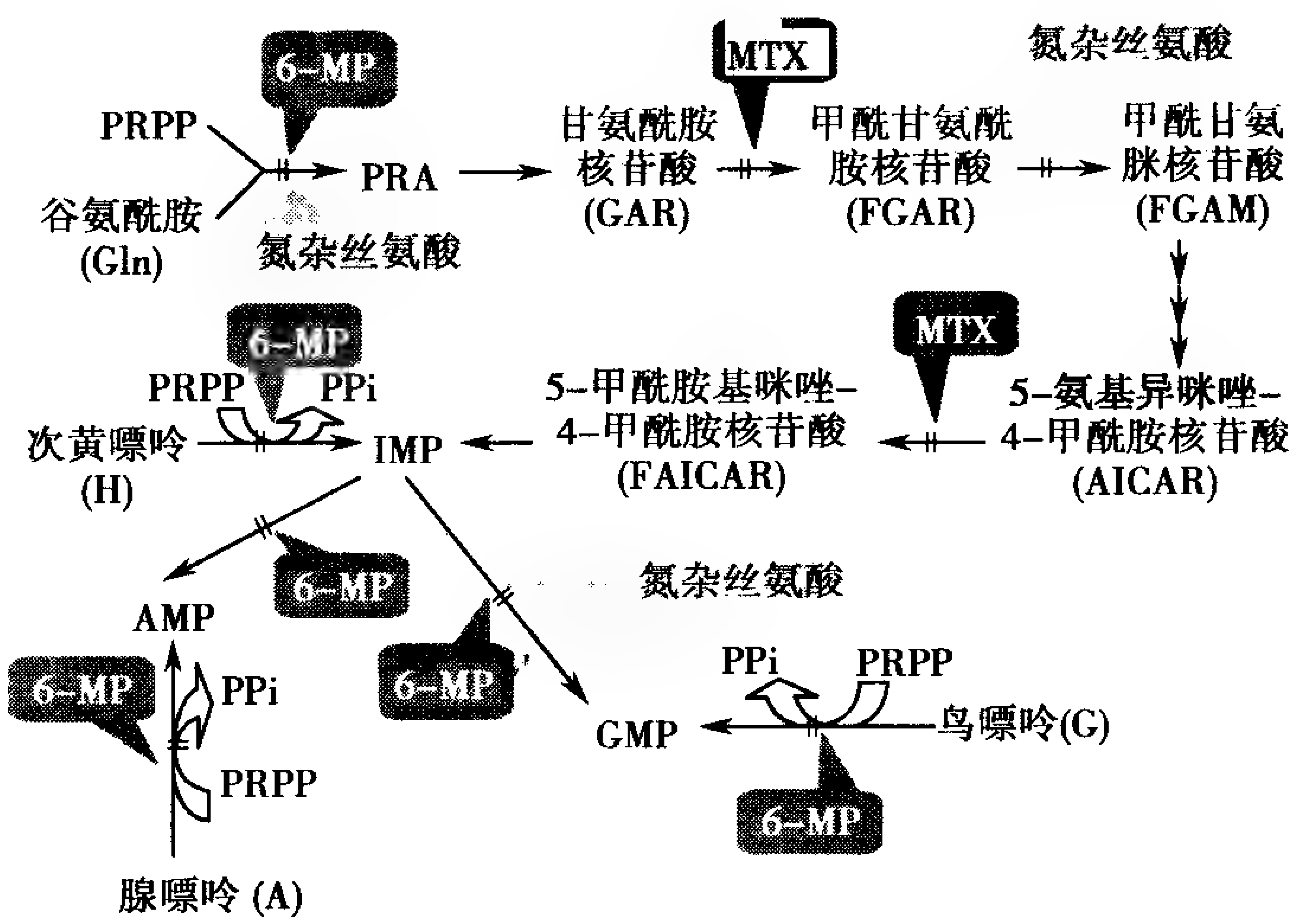
经过激酶的作用，上述 dNDP 再磷酸化成三磷酸脱氧核苷。

（五）嘌呤核苷酸的抗代谢物是一些嘌呤、氨基酸或叶酸类似物

嘌呤核苷酸的抗代谢物是一些嘌呤、氨基酸或叶酸等的类似物。它们主要以竞争性抑制或“以假乱真”等方式干扰或阻断嘌呤核苷酸的合成代谢，从而进一步阻止核酸以及蛋白质的生物合成。肿瘤细胞的核酸及蛋白质合成十分旺盛，因此这些抗代谢物具有抗肿瘤作用。

嘌呤类似物有6-巯基嘌呤（6-mercaptopurine，6MP）、6-巯基鸟嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤等，其中以6MP在临床上应用较多。6MP的结构与次黄嘌呤相似，唯一不同的是分子中C_6上由巯基取代。

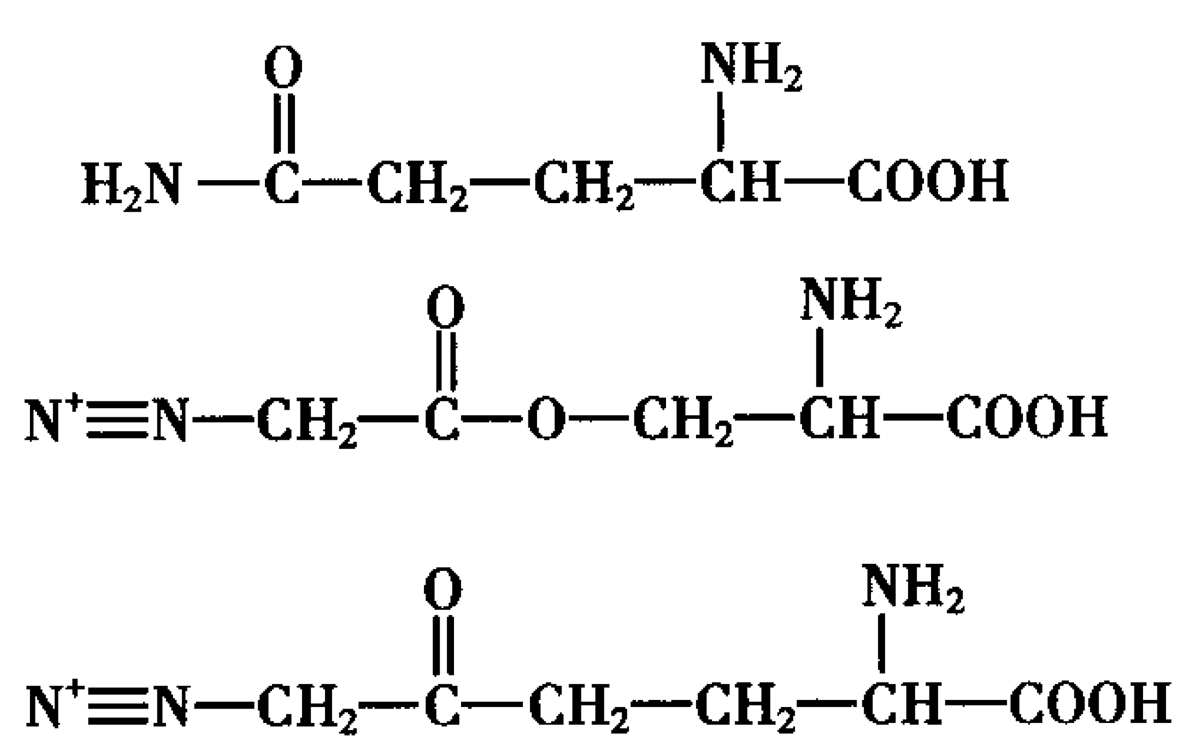
6MP可在体内经磷酸核糖化而生成6MP核苷酸，并以这种形式抑制IMP转变为AMP及GMP的反应。6MP还能直接通过竞争性抑制，影响次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶，使PRPP分子中的磷酸核糖不能向鸟嘌呤及次黄嘌呤转移，阻止了补救合成途径。此外，6MP核苷酸由于结构与IMP相似，还可以反馈抑制PRPP酰胺转移酶而干扰磷酸核糖胺的形成，从而阻断嘌呤核苷酸的从头合成（图8-7）。



● 图 8-7　嘌呤核苷酸抗代谢物的作用

→‖ 表示抑制基取代了羟基

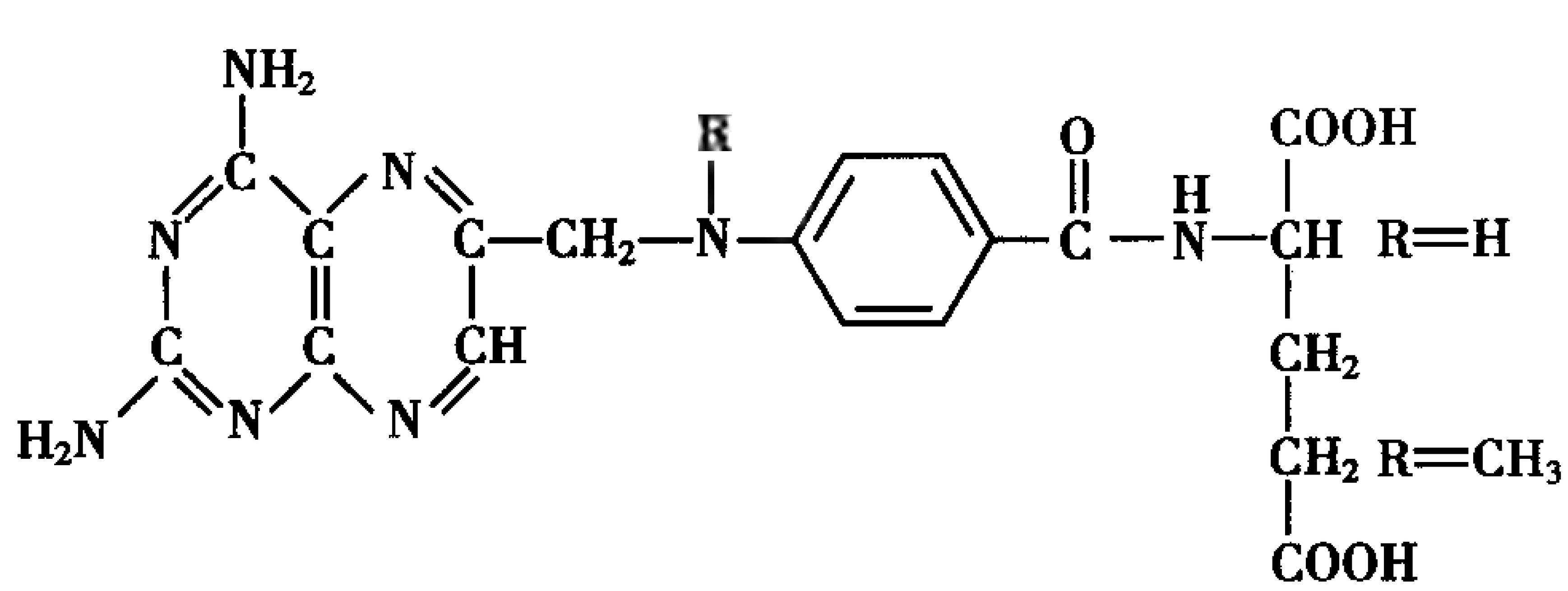
氨基酸类似物有氮杂丝氨酸（azaserine）及6-重氮-5-氧正亮氨酸（diazonorleucine）等。它们的结构与谷氨酰胺相似，可干扰谷氨酰胺在嘌呤核苷酸合成中的作用，从而抑制嘌呤核苷酸的合成。



谷氨酰胺

氮杂丝氨酸(重氮乙酰丝氨酸)

6-重氮-5-氧正亮氨酸



氨蝶呤

甲氨蝶呤

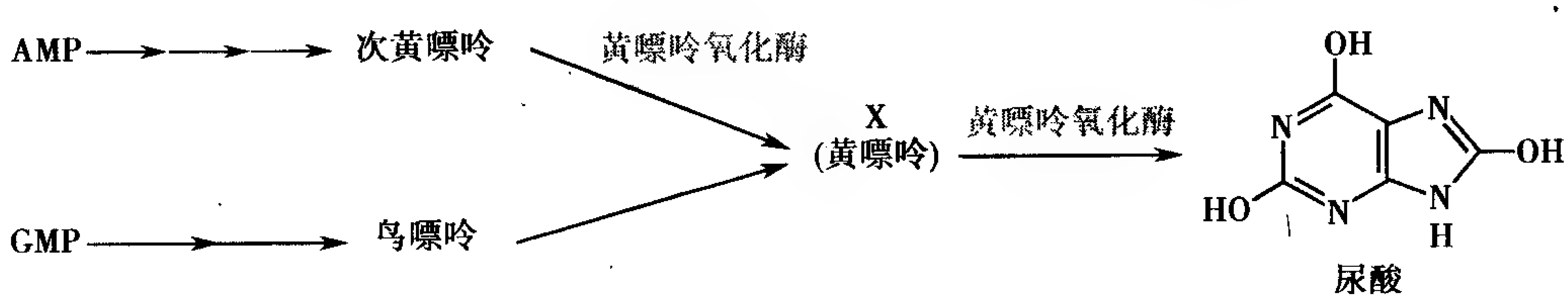
氨蝶呤（aminopterin）及甲氨蝶呤（methotrexate，MTX）都是叶酸的类似物，能竞争性抑制二氢叶酸还原酶，使叶酸不能还原成二氢叶酸及四氢叶酸。因此嘌呤分子中来自一碳单位的 C_8 及 C_2 均得不到供应，从而抑制了嘌呤核苷酸的合成。MTX 在临床上用于白血病等癌瘤的治疗。

应该指出的是，上述药物缺乏对癌瘤细胞的特异性，故对增殖速度较旺盛的某些正常组织亦有杀伤性，因而有较大的毒副作用。

嘌呤核苷酸抗代谢物的作用部位可归纳如图 8-7。

二、嘌呤核苷酸的分解代谢终产物是尿酸

体内核苷酸的分解代谢类似于食物中核苷酸的消化过程。首先，细胞中的核苷酸在核苷酸酶的作用下水解成核苷。核苷经核苷磷酸化酶作用，磷酸解成自由的碱基及 1-磷酸核糖。嘌呤碱既可以参加核苷酸的补救合成，也可进一步水解。人体内，嘌呤碱最终分解生成尿酸（uric acid），随尿排出体外。反应过程简化如图 8-8。AMP 生成次黄嘌呤，后者在黄嘌呤氧化酶（xanthine oxidase）作用下氧化成黄嘌呤，最后生成尿酸。GMP 生成鸟嘌呤，后者转变成黄嘌呤，最后也生成尿酸。嘌呤脱氧核苷经过相同途径进行分解代谢。体内嘌呤核苷酸的分解代谢主要在肝、小肠及肾中进行，黄嘌呤氧化酶在这些脏器中活性较强。



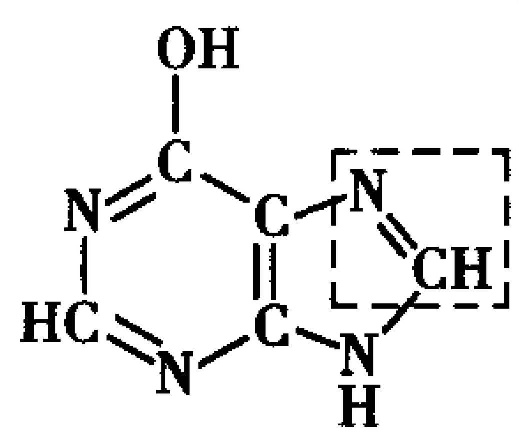
●图 8-8　嘌呤核苷酸的分解代谢

嘌呤代谢与痛风

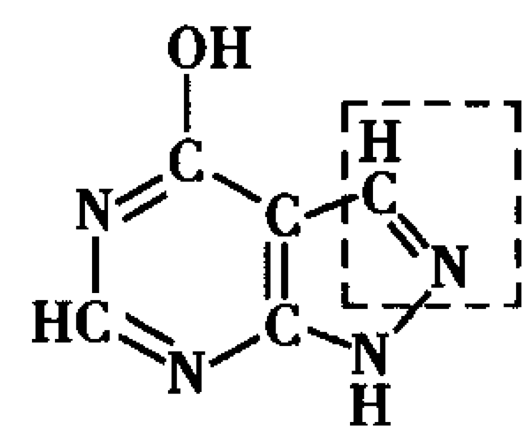
痛风症是指患者血中尿酸含量增高（一般高于 470μmol/L），导致尿酸盐沉积于关节、软组织、软骨及肾等处，首先引起炎症反应——急性痛风关节炎，最终导致慢性痛风关节炎、尿路结石等，即为原发性痛风症；若是肾功能障碍引起尿酸排出减少而产生的痛风属继发性痛风症。原发性痛风症系嘌呤代谢相关酶的缺乏所致，主要是 HGPRT 活性减少，限制了嘌呤核苷酸的补救合成，而有利于尿酸的生成。

尿酸是人体嘌呤分解代谢的终产物。正常人血浆中尿酸含量为 0.12～0.36mmol/L（2～6mg%）。男性平均为 0.27mmol/L（4.5mg/dl），女性平均为 0.21mmol/L（3.5mg/dl）左右，尿酸的水溶性较差。痛风症（gout）患者血中尿酸含量升高，当超过 8mg% 时，尿酸盐晶体即可沉积于关节、软组织、软骨及肾等处，而导致关节炎、尿路结石及肾疾病。痛风症多见于成年男性，其原因尚不完全清楚，可能与嘌呤核苷酸代谢酶的缺陷有关。此外，当进食高嘌呤饮食、体内核酸大量分解（如白血病、恶性肿瘤等）或肾疾病而尿酸排泄障碍时，均可导致血中尿酸升高。临床上常用别嘌呤醇（allopurinol）治疗痛风症。别嘌呤醇与次黄嘌呤结构类似，只是分子中 N_7 与 C_8 互换了位置，故可抑制黄嘌呤氧

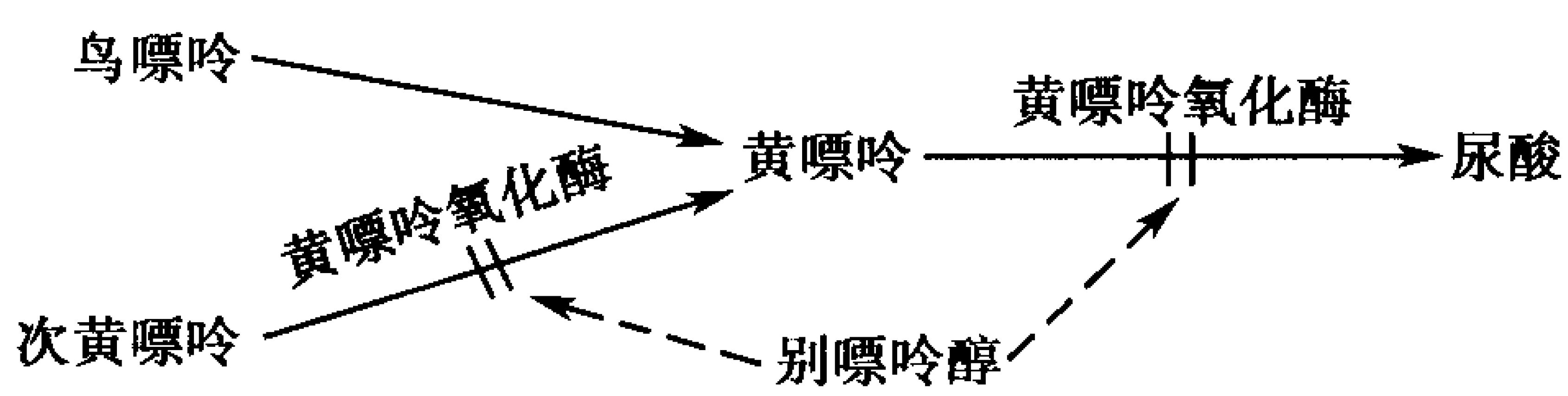
化酶，从而抑制尿酸的生成。黄嘌呤、次黄嘌呤的水溶性较尿酸大得多，不会沉积形成结晶。同时，别嘌呤与 PRPP 反应生成别嘌呤核苷酸，这样一方面消耗 PRPP 而使其含量减少，另一方面别嘌呤核苷酸与 IMP 结构相似，又可反馈抑制嘌呤核苷酸从头合成的酶。这两方面的作用均可使嘌呤核苷酸的合成减少。



次黄嘌呤



别嘌呤醇



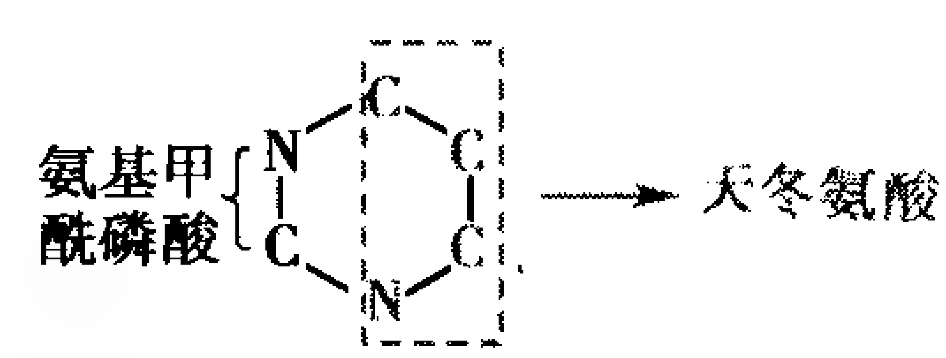
第二节　嘧啶核苷酸的合成与分解代谢

一、嘧啶核苷酸的合成同样有从头合成与补救合成两条途径

与嘌呤核苷酸一样，体内嘧啶核苷酸的合成也有两条途径，即从头合成与补救合成。

(一) 嘧啶核苷酸的从头合成比嘌呤核苷酸简单

1. 从头合成途径同位素示踪实验证明，嘧啶核苷酸中嘧啶碱合成的原料来自谷氨酰胺、CO_2 和天冬氨酸，如图 8-9 所示。

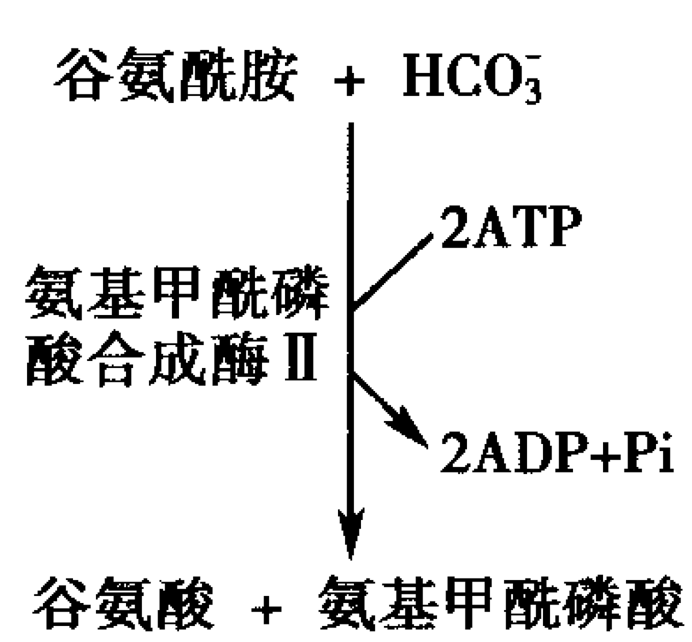


●图 8-9　嘌呤碱合成的元素来源

与嘌呤核苷酸的从头合成途径不同，嘧啶核苷酸的合成是先合成嘧啶环，然后再与磷酸核糖相连而成的。

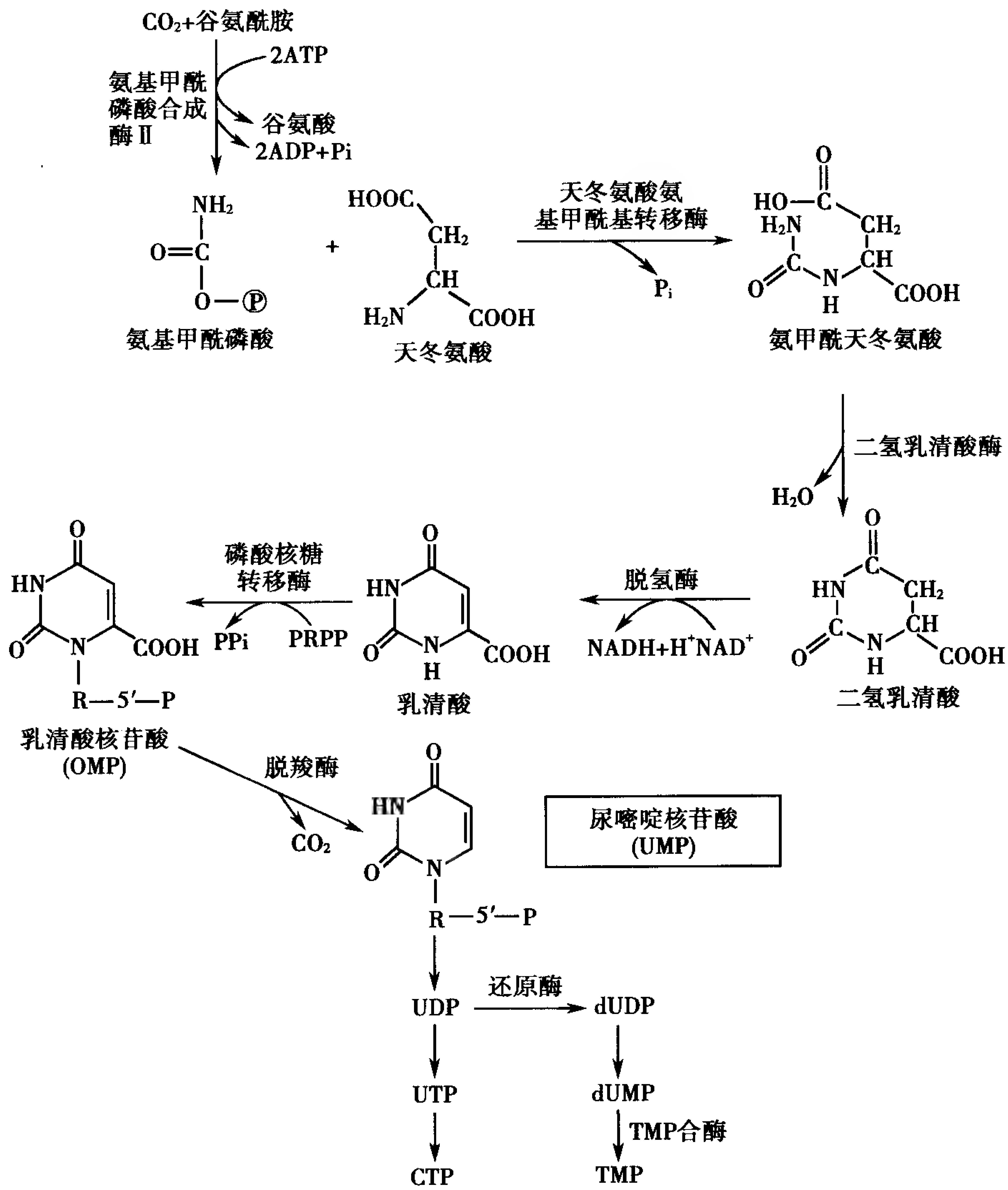
嘧啶核苷酸合成的过程如下。

(1) 尿嘧啶核苷酸的合成：嘧啶环的合成开始于氨基甲酰磷酸的生成。正如氨基酸代谢一章所讨论的，氨基甲酰磷酸也是尿素合成的原料。但是，尿素合成中所需的氨基甲酰磷酸是在肝线粒体中由氨基甲酰磷酸合成酶Ⅰ催化生成的，而嘧啶合成所用的氨基甲酰磷酸则是在细胞液中用谷氨酰胺为氮源，由氨基甲酰磷酸合成酶Ⅱ催化生成的。这两种合成酶的性质不同。



上述生成的氨基甲酰磷酸在胞液中的天冬氨酸氨基甲酰转移酶（aspartate transcarbamoylase）的催化下，与天冬氨酸化合生成氨甲酰天冬氨酸。后者经二氢乳清酸酶催化脱水，形成具有嘧啶环的二氢乳清酸，再经二氢乳清酸脱氢酶的作用，脱氢成为乳清酸（orotic acid）。乳清酸不是构成核酸的嘧啶碱，但它在乳清酸磷酸核糖转移酶催化下可与 PRPP 化合，生成乳清酸核苷酸，后者再由乳清酸核苷酸脱羧酶催化脱去羧基，即为组成

核酸分子的尿嘧啶核苷酸（uridine monophosphate，UMP）（图 8-10）。嘧啶核苷酸的合成主要在肝内进行。



● 图 8-10　嘧啶核苷酸的合成代谢

现已阐明，在真核细胞中嘧啶核苷酸合成的前三个酶，即氨基甲酰磷酸合成酶Ⅱ、天冬氨酸氨基甲酰转移酶和二氢乳清酸酶，位于分子量约为 200000 的同一条多肽链上，因此是一个多功能酶；后两个酶也是位于同一条多肽链上的多功能酶。因此更有利于以均匀的速度参与嘧啶核苷酸的合成。

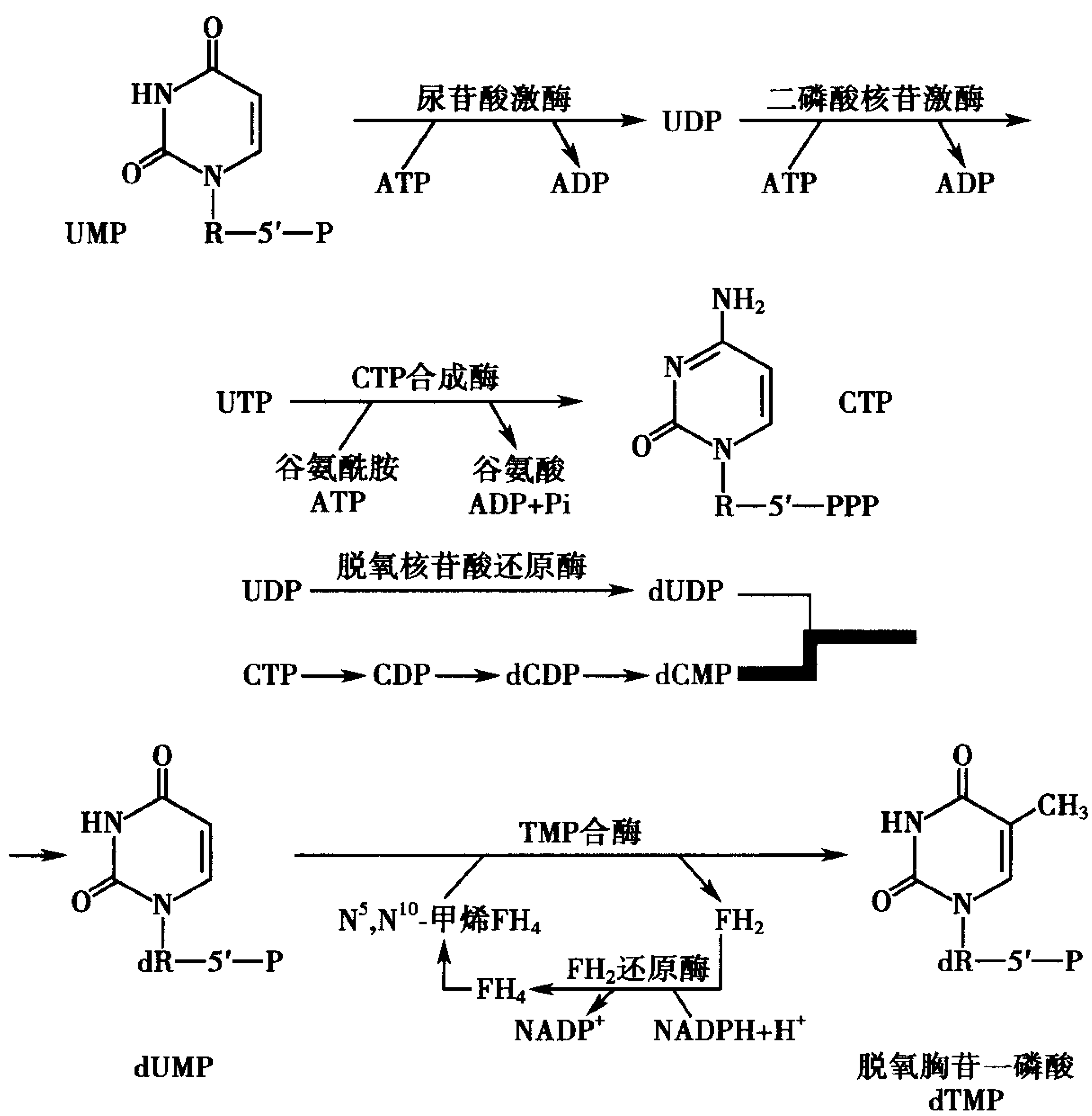
（2）CTP 的合成：UMP 通过尿苷酸激酶和二磷酸核苷激酶的连续作用，生成三磷酸尿苷（UTP），并在 CTP 合成酶催化下，消耗一分子 ATP，从谷氨酰胺接受氨基而成为三磷酸胞苷（CTP）。

（3）脱氧胸腺嘧啶核苷酸（dTMP 或 TMP）的生成：dTMP 是由脱氧尿嘧啶核苷酸（dUMP）经甲基化而生成的。反应由胸苷酸合酶（thymidylate synthase）催化，N^5，N^{10}-甲烯四氢叶酸作为甲基供体。N^5，N^{10}-甲烯四氢叶酸提供甲基后生成的二氢叶酸又可在二氢叶酸还原酶的作用下，重新生成四氢叶酸。dUMP 可来自两个途径：一是 dUDP 的

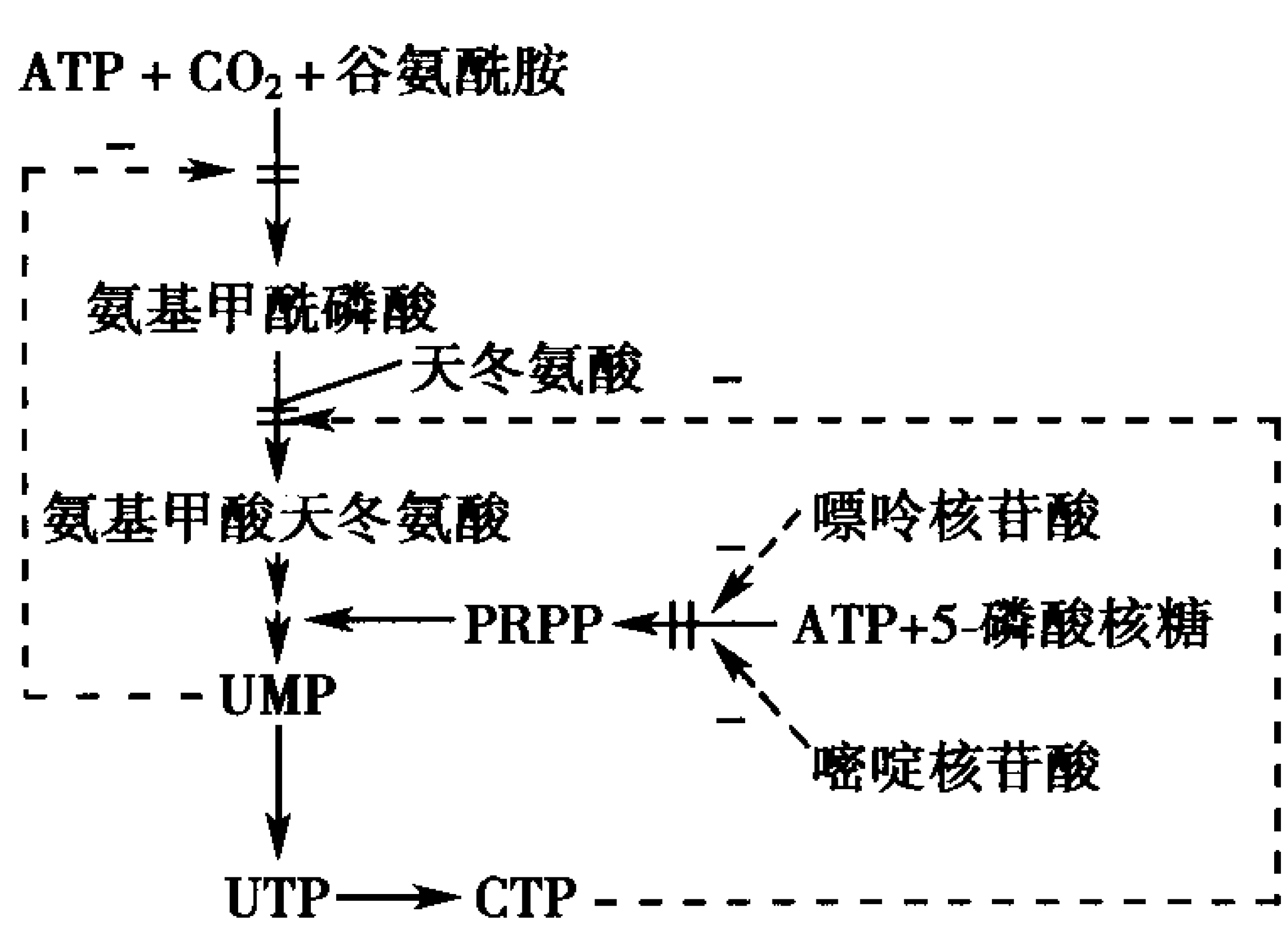
水解，另一个是 dCMP 的脱氨基，以后一种为主。胸苷酸合成与二氢叶酸还原酶常可被用于癌瘤化疗的靶点。

2. 从头合成的调节　细菌中，天冬氨酸氨基甲酰转移酶是嘧啶核苷酸从头合成的主要调节酶。但是，哺乳类动物细胞中，嘧啶核苷酸合成的调节酶则主要是氨基甲酰磷酸合成酶Ⅱ，它受 UMP 抑制。这两种酶均受反馈机制的调节。此外，哺乳类动物细胞中，上述 UMP 合成起始和终末的两个多功能酶还可受到阻遏或去阻遏的调节。同位素参入实验表明，嘧啶与嘌呤的合成有着协调控制关系，两者的合成速度通常是平行的。

由于 PRPP 合成酶是嘧啶与嘌呤两类核苷酸合成过程中共同需要的酶，它可同时接受嘧啶核苷酸及嘌呤核苷酸的反馈抑制。



现将嘧啶核苷酸合成的调节部位图示如下：



（二）嘧啶核苷酸的补救合成途径与嘌呤核苷酸类似

嘧啶磷酸核糖转移酶是嘧啶核苷酸补救合成的主要酶，催化反应的通式如下：

$$嘧啶 + PRPP \xrightarrow{嘧啶磷酸核糖转移酶} 磷酸嘧啶核苷 + PPi$$

此酶已从人红细胞中纯化，它能利用尿嘧啶、胸腺嘧啶及乳清酸作为底物（实际上与前述的乳清酸磷酸核糖转移酶是同一种酶），但对胞嘧啶不起作用。

尿苷激酶也是一种补救合成酶，催化尿苷生成尿苷酸。

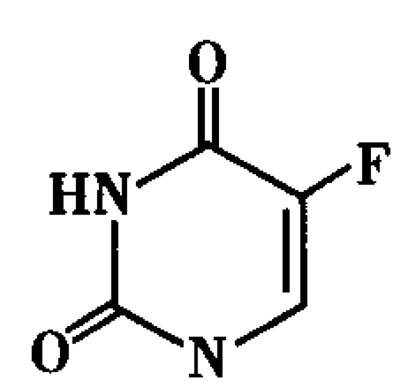
脱氧胸苷可通过胸苷激酶而生成 dTMP。此酶在正常肝中活性很低，再生肝中活性升高，恶性肿瘤中明显升高，并与恶性程度有关。

（三）嘧啶核苷酸的抗代谢物也是嘧啶、氨基酸或叶酸等的类似物

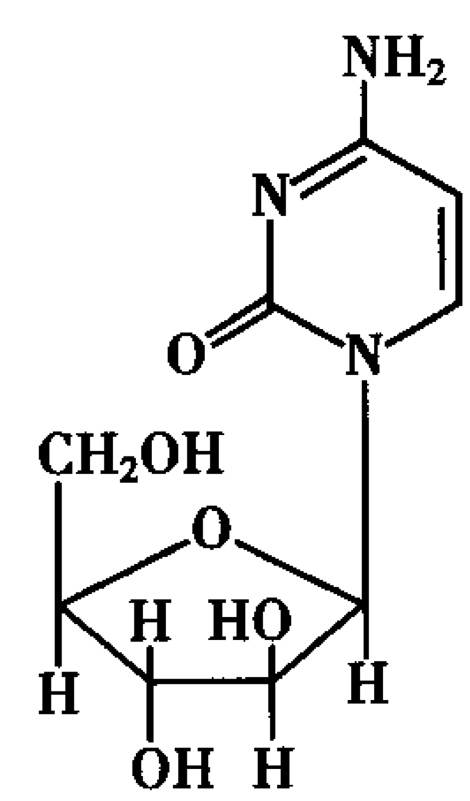
与嘌呤核苷酸一样，嘧啶核苷酸的抗代谢物是一些嘧啶、氨基酸或叶酸等的类似物。它们对代谢的影响及抗肿瘤作用与嘌呤抗代谢物相似。

嘧啶的类似物主要有 5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-FU），它的结构与胸腺嘧啶相似。5-FU 本身并无生物学活性，必须在体内转变成一磷酸脱氧核糖氟尿嘧啶核苷（FdUMP）及三磷酸氟尿嘧啶核苷（FUTP）后，才能发挥作用。FdUMP 与 dUMP 的结构相似，是胸苷酸合酶的抑制剂，使 dTMP 合成受到阻断。FUTP 可以以 FUMP 的形式参入 RNA 分子，异常核苷酸的参入破坏了 RNA 的结构与功能。

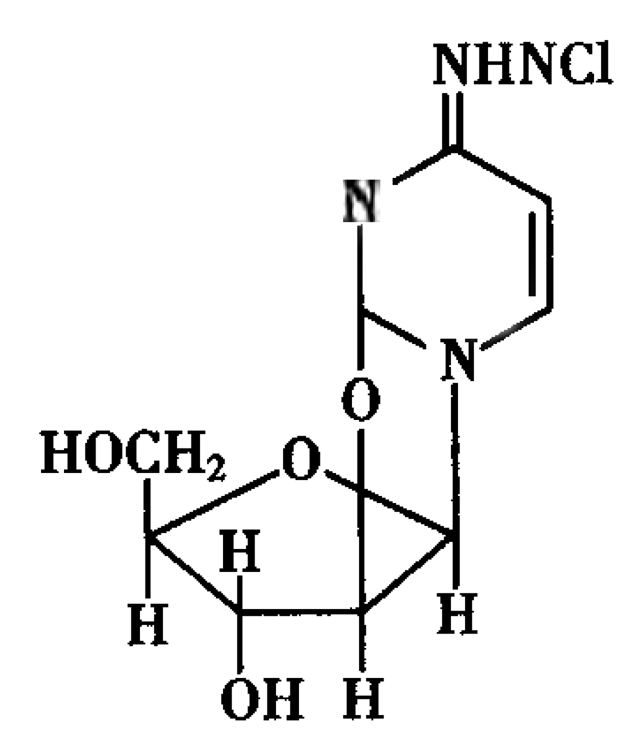
氨基酸类似物、叶酸类似物已在嘌呤抗代谢物中介绍。例如，由于氮杂丝氨酸类似谷氨酰胺，可以抑制 CTP 的生成；甲氨蝶呤干扰叶酸代谢，使 dUMP 不能利用一碳单位甲基化而生成 dTMP，进而影响 DNA 合成。另外，某些改变了核糖结构的核苷类似物，例如阿糖胞苷和环胞苷也是重要的抗癌药物。阿糖胞苷能抑制 CDP 还原成 dCDP，也能影响 DNA 的合成。



5-氟尿嘧啶(5-FU)

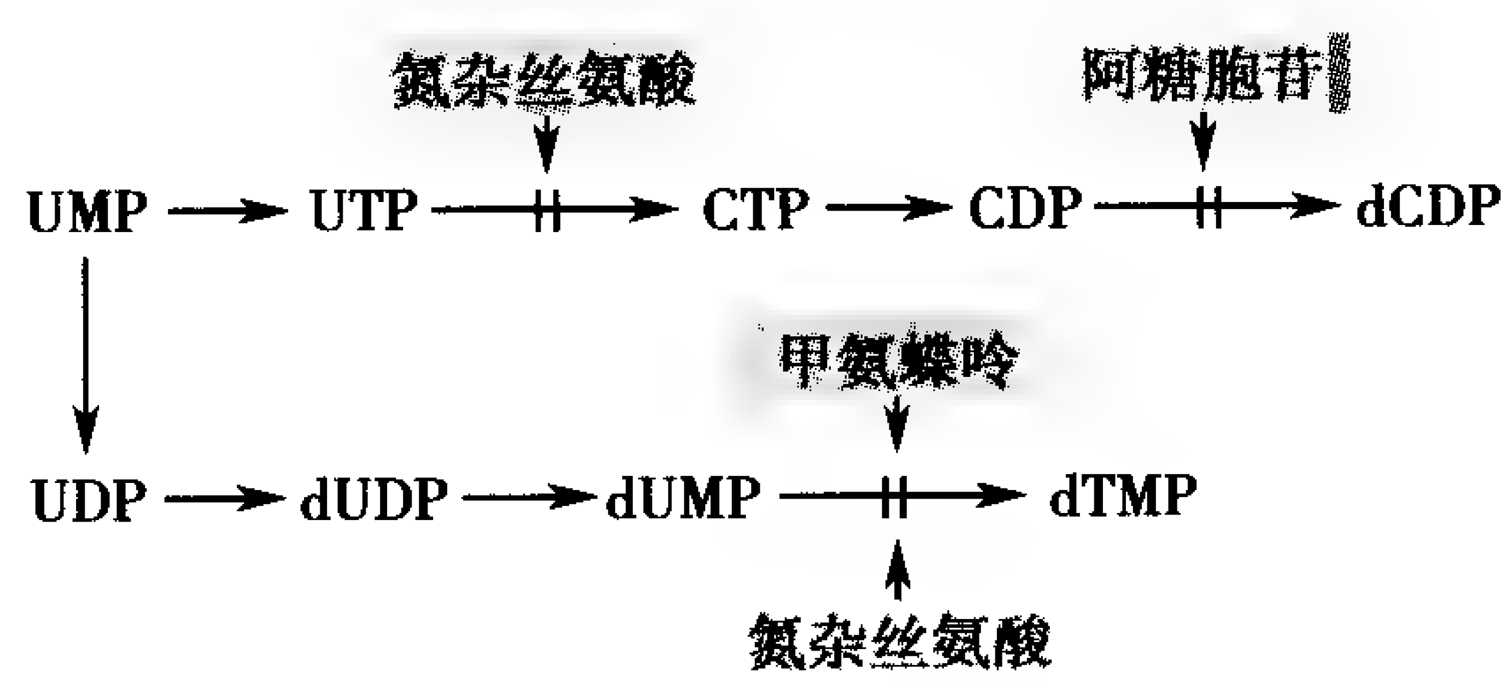


阿糖胞苷



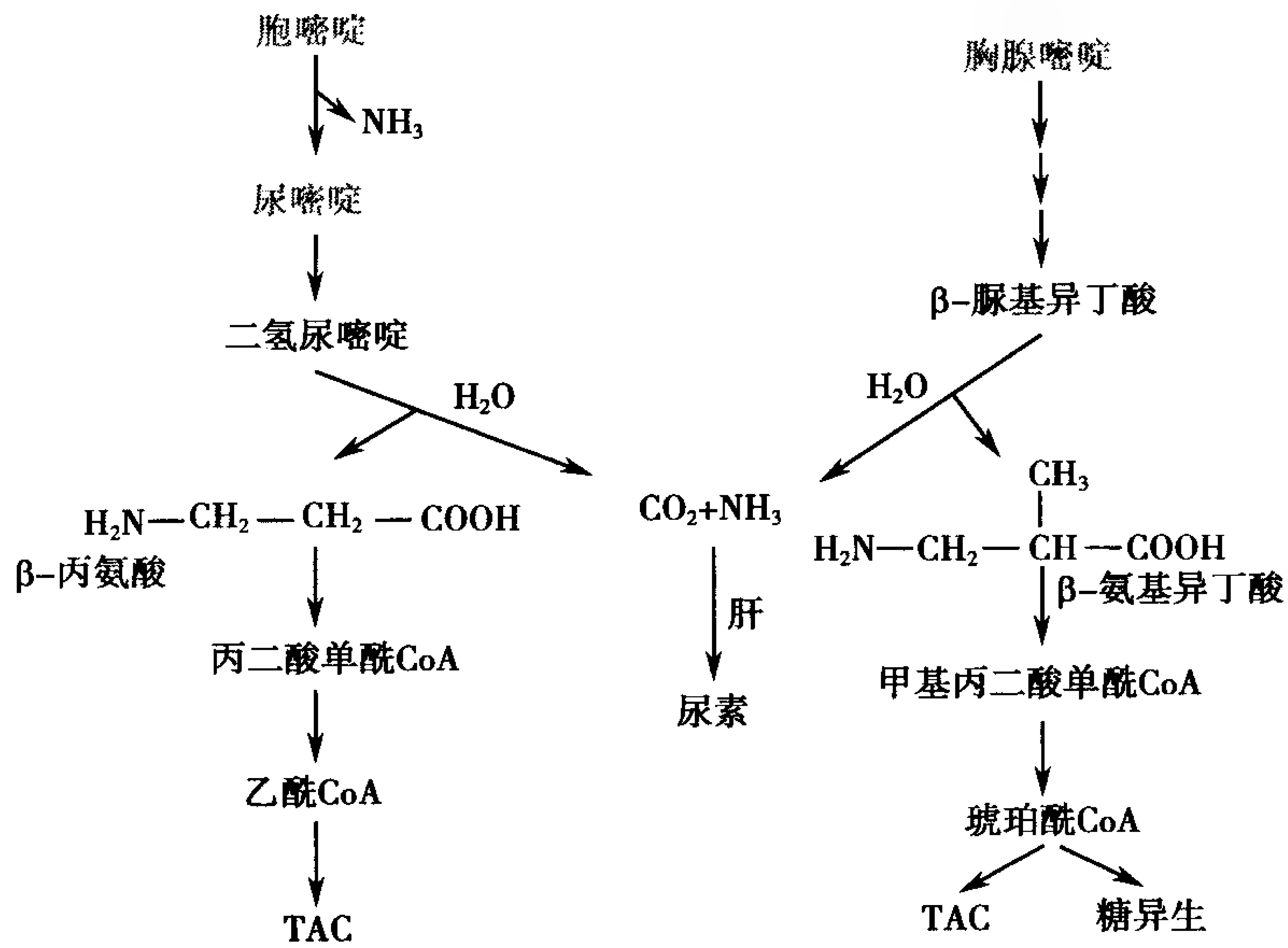
环胞苷

嘧啶核苷酸类似物的作用环节可归纳如下：（‖ 表示抑制）



二、嘧啶核苷酸的分解代谢

嘧啶核苷酸首先通过核苷酸酶及核苷磷酸化酶的作用，除去磷酸及核糖，产生的嘧啶碱再进一步分解。胞嘧啶脱氨基转变成尿嘧啶。尿嘧啶还原成二氢尿嘧啶，并水解开环，最终生成 NH_3、CO_2 及 β-丙氨酸。胸腺嘧啶降解成 β-氨基异丁酸（β-aminoisobutyric acid）（图 8-11），其可直接随尿排出或进一步分解。食入含 DNA 丰富的食物、经放射线治疗或



●图 8-11　嘧啶碱的分解代谢

化学治疗的癌症病人，尿中β-氨基异丁酸排出量增多。嘧啶碱的降解代谢主要在肝进行。

与嘌呤碱的分解产生尿酸不同，嘧啶碱的降解产物均易溶于水。

小　　结

核苷酸具有多种重要的生理功能，其中最主要的是作为合成核酸分子的原料。除此，还参与能量代谢、代谢调节等过程。体内的核苷酸主要由机体细胞自身合成。食物来源的嘌呤和嘧啶极少被机体利用。

体内嘌呤核苷酸的合成有两条途径：从头合成和补救合成。从头合成的原料是磷酸核糖、氨基酸、一碳单位及 CO_2 等简单物质，在 PRPP 的基础上经过一系列酶促反应，逐步形成嘌呤环。首先生成 IMP，然后再分别转变成 AMP 和 GMP。从头合成过程受着精确的反馈调节。补救合成实际上是现成嘌呤或嘌呤核苷的重新利用，虽然合成含量极少，但也有重要的生理意义。

机体也可以从头合成嘧啶核苷酸，但不同的是先合成嘧啶环，再磷酸核糖化而生成核苷酸。嘧啶核苷酸的从头合成也受反馈调控。

体内的脱氧核糖核苷酸是由各自相应的核糖核苷酸在二磷酸水平上还原而成的。核糖核苷酸还原酶催化此反应。四氢叶酸携带的一碳单位是合成胸苷酸过程中甲基的必要来源。

根据嘌呤和嘧啶核苷酸的合成过程，可以设计多种抗代谢物，包括嘌呤、嘧啶类似物，叶酸类似物，氨基酸类似物等。这些抗代谢物在抗肿瘤治疗中有重要作用。

嘌呤在人体内分解代谢的终产物是尿酸，黄嘌呤氧化酶是这个代谢过程的重要酶。痛风症主要是由于嘌呤代谢异常，尿酸生成过多而引起的。嘧啶分解后产生的β-氨基酸可随尿排出或进一步代谢。

（吴士良　周爱儒）

第九章　物质代谢的联系与调节

物质代谢是生命的本质特征，是生命活动的物质基础。多细胞生物体的物质新陈代谢包括相互联系的三个功能部分：

第一，食物中的糖、脂及蛋白质经消化吸收进入体内，通过细胞进行的分解代谢氧化成 H_2O 和 CO_2，释出能量用于合成 ATP 以满足生命活动的需要，生成的代谢中间物可作为合成代谢的底物分子。

第二，多种细胞分子的生物合成组成合成代谢，以分解代谢产生的某些中间物作为底物，生成的 ATP 提供能量，通过复杂反应过程合成核苷酸、氨基酸、单糖等生物分子。

第三，以合成代谢产生的有机分子作为构件，消耗能量，生成体现生物功能和信息的蛋白质、核酸、多糖等生物大分子。因此，机体需要和环境之间不断进行物质交换。

机体需要对物质代谢过程不断进行调节和整合，以适应环境的变化。代谢整合（metabolic integration）包括产能的分解代谢与耗能的合成代谢之间的整合，各种代谢途径之间的整合，以及生物体各组织器官间代谢的整合，而物质代谢间的相互联系是机体代谢整合的基础。

第一节　物质代谢的特点

一、体内各种物质代谢过程互相联系形成一个整体

体内各种物质包括糖、脂、蛋白质、水、无机盐、维生素等的代谢过程不是彼此孤立的，而是在细胞内同时进行，且彼此互相联系，或相互转变，或相互依存，构成生物体这一统一的整体。例如人类摄取的各类食物同时含有蛋白质、脂类、糖类、水、无机盐及维生素等，从消化吸收起一直到中间代谢、排泄，各种物质代谢都是同时进行的。各种物质代谢之间也互有联系，相互依存。例如糖、脂在体内氧化释出的能量保证了生物大分子蛋白质、核酸、多糖等合成时的能量需要，合成的各种酶蛋白作为生物催化剂又可促进体内糖、脂、蛋白质等各种物质代谢得以迅速进行。

二、机体物质代谢不断受到精细调节

正常情况下，机体能通过精细的调节机制，不断调节各种物质代谢的强度、方向和速率。以保证机体各种物质代谢能适应内外环境不断的变化，有条不紊地进行。代谢调节普遍存在于生物界，是生物的重要特征。

三、各组织、器官物质代谢各具特色

机体各组织、器官的结构不同，各有特定的生理功能。它们除具有细胞基本的代谢过程外，还含有不同的酶系种类和含量，以适应和完成其特征的代谢途径及生理功能，各具特色。例如肝在糖、脂、蛋白质代谢上具有特殊重要的作用，是人体物质代谢的枢纽。脂肪组织的功能是储存和动员脂肪，含有脂蛋白脂酶及特有的激素敏感甘油三酯脂肪酶，而

正常脑组织及红细胞则以葡萄糖为唯一能源，因为它们不储存糖原。

四、体内各种代谢物都具有共同的代谢池

同一代谢物，无论是体外摄入的成分还是由体内各组织细胞生成的，在进行中间代谢时，不分彼此，参加到共同的代谢池中参与代谢。以血糖为例，无论消化吸收的糖、肝糖原分解的葡萄糖，还是氨基酸或甘油经糖异生转化生成的糖，均可共同组成血糖代谢池，参与各种组织的代谢。

五、ATP 是机体储存能量和消耗能量的共同形式

糖、脂和蛋白质在体内分解氧化释出能量的很大部分，转变为细胞有用的高能化合物ATP 的化学能。生命活动的耗能过程，如生长、发育、繁殖、运动等所涉及的蛋白质、核酸、多糖等生物大分子的合成，肌收缩，神经冲动的传导，以及细胞渗透压及形态的维持均直接利用 ATP 能量。ATP 作为能量载体，使产生能量的物质分解代谢与消耗能量的合成代谢间相互偶联。

六、NADPH 提供合成代谢所需的还原当量

许多参与氧化分解代谢的脱氢酶常以 NAD^+ 为辅酶，而参与还原性合成代谢的还原酶则多以 NADPH 为辅酶，提供还原当量。NADPH 主要在糖分解代谢的戊糖磷酸途径中生成，可以为由乙酰辅酶 A 合成脂酸及合成胆固醇的合成代谢过程提供必需的还原当量。NADPH 也是偶联分解代谢与合成代谢的特殊功能分子。

第二节　物质代谢的相互联系

一、各种能源物质的代谢相互联系相互制约

糖、脂和蛋白质都是能源分子可在体内氧化供能。三大营养物在体内分解氧化的代谢途径虽各不相同，但乙酰辅酶 A 是它们共同的中间代谢物，三羧酸循环和氧化磷酸化成为糖、脂、蛋白质最后分解的共同代谢途径，释出的能量均需转化为 ATP 的化学能。

从能量供应的角度看，机体对这三大营养素的利用可以互相代替，并互相制约。一般情况下，机体优先利用能源分子的次序是糖原、脂肪和蛋白质（主要是肌肉蛋白），所以供能以糖及脂为主，并尽量节约蛋白质的消耗。这不仅因为动物及人摄取的食物中以糖类为最多，占总热量的 50%～70%，脂肪摄入量虽然不多，变动在 10%～40%，但它是机体储能的主要形式，可达体重的 20%或更多（肥胖者可达 30%～40%），而且因为体内的蛋白质是组成细胞的最重要的成分，通常并无多余储存。由于糖、脂、蛋白质分解代谢有共同的终末途径，如任一供能物质的分解代谢占优势，常能通过代谢调节来抑制和节约其他供能物质的降解。ATP 在能量物质代谢调节中是重要变构效应物，ATP 浓度作为细胞能量状态的指标。例如脂肪分解增强、生成的 ATP 增多，ATP/ADP 比值增高，可变构抑制糖分解代谢中的限速酶——6-磷酸果糖激酶-1 活性，从而抑制糖分解代谢。相反，若供能物质不足，体内 ATP 减少，ADP 积存增多，则可变构激活 6-磷酸果糖激酶-1，加速体内糖的分解代谢。又如疾病不能进食或无食物供给时，由于机体储存的肝糖原及肌糖原

不够饥饿时1天的需要，为保证血糖恒定以满足脑组织对葡萄糖的需要，则肝糖异生增强，蛋白质分解加强。如饥饿持续进行至3～4周，而长期糖异生增强使蛋白质大量分解，蛋白质持续减少将威胁生命，故机体通过调节作用转向以保存蛋白质为主。此时体内各组织包括脑组织都以脂酸及酮体为主要能源，蛋白质的分解明显降低。

二、糖、脂和蛋白质代谢通过中间代谢物而相互联系

体内糖、脂、蛋白质和核酸等重要代谢过程也是相互关联的。它们各自通过两种代谢途径交汇时的共同中间产物，三羧酸循环和氧化磷酸化等联成整体，相互影响。三者之间可以互相转变，而一种物质代谢障碍时又可引起其他物质代谢的紊乱，如糖尿病时糖代谢的障碍，可引起脂代谢、蛋白质代谢甚至水盐代谢的紊乱。

（一）体内糖可转变脂肪，但（偶数）脂肪酸不能转变成糖

正常饮食摄入的糖量过多超过体内能量消耗时，除合成糖原储存在肝及肌外，生成的柠檬酸及ATP可变构激活乙酰辅酶A羧化酶，使由糖代谢产生的大量乙酰辅酶A得以羧化成丙二酰辅酶A，进而合成脂酸及脂肪在脂肪组织中储存，即糖可以转变为脂肪。通过上述过程，摄取不含脂肪的高糖膳食同样可使人肥胖及血甘油三酯升高。然而，脂肪主要部分的脂酸不能在体内转变为糖。这是因为丙酮酸氧化脱羧生成乙酰辅酶A的反应是不可逆过程，脂酸分解生成的乙酰辅酶A不能转变为丙酮酸。只有脂肪分解产物之一甘油可以在肝、肾、肠等组织中的甘油激酶的作用下转变成磷酸-甘油，进而转变成糖，但其量和脂肪中大量脂酸相比是极少的。此外，脂肪分解代谢的强度及顺利进行，还和糖代谢的正常进行密切相关。当饥饿或糖供给不足或糖代谢障碍时，可引起脂肪大量动员，脂酸进入肝，β-氧化生成酮体量增加，由于糖的不足，糖代谢中间物草酰乙酸相对不足，脂酸分解生成的过量酮体不能及时通过三羧酸循环氧化，造成血酮体升高，产生高酮血症。

（二）体内糖与大部分氨基酸碳架部分可以相互转变

体内组成蛋白质的20种氨基酸，除生酮氨基酸（亮氨酸、赖氨酸）外，通过转氨或脱氨作用所生成的相应α-酮酸都可转变成某些糖代谢的中间代谢物，如丙酮酸、草酰乙酸，α-酮戊二酸等，它们既可通过三羧酸循环及氧化磷酸化生成CO_2及H_2O并释出能量，生成ATP，也可循糖异生途径转变为糖。如精氨酸、组氨酸及脯氨酸均可通过转变成谷氨酸进一步脱氨生成α-酮戊二酸，经草酰乙酸转变成磷酸烯醇式丙酮酸，再循糖异生途径转变成糖。同时，糖代谢的一些中间代谢物，如丙酮酸、α-酮戊二酸、草酰乙酸等也可氨基化成某些非必需氨基酸。但苏氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸及色氨酸等8种氨基酸不能由糖代谢中间物转变而来，必须由食物供给，因此称之为必需氨基酸。由此可见，20种氨基酸除亮氨酸及赖氨酸外均可转变为糖，而糖代谢中间代谢物仅能在体内转变成12种非必需氨基酸，其余8种必需氨基酸必须从食物摄取。所以食物中蛋白质的营养不能为糖、脂替代，而蛋白质却能替代糖和脂肪供能。

（三）脂类不能转变成氨基酸，但氨基酸能转变成脂肪

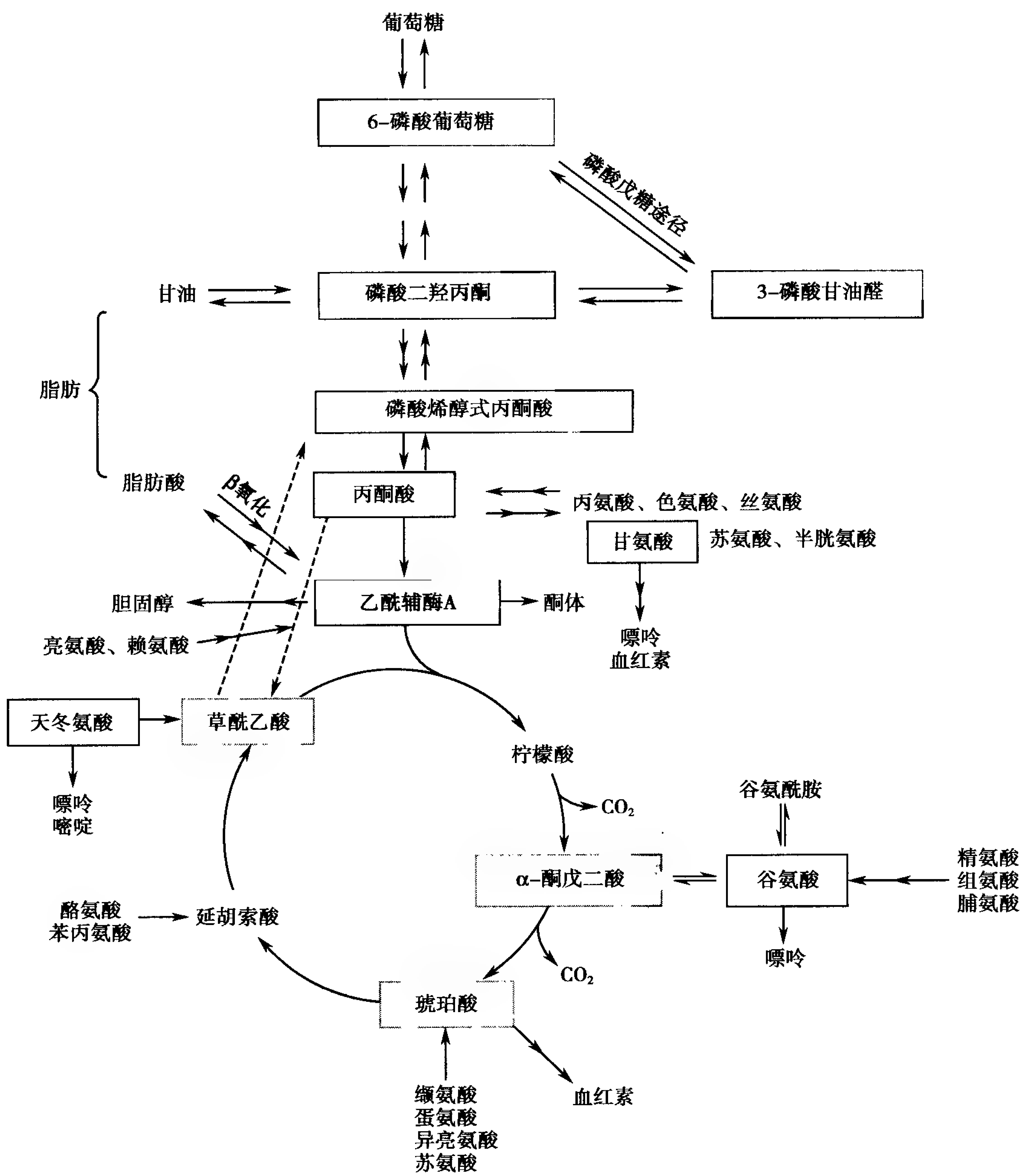
体内无论生糖、生酮或生酮并生糖氨基酸（异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和苏氨酸）分解后均生成乙酰辅酶A，后者经还原缩合反应可合成脂酸进而合成脂肪，因此蛋白质可转变为脂肪。乙酰辅酶A也可合成类脂成分胆固醇。此外，某些氨基酸可作为合成磷脂的原料，如丝氨酸脱羧可变为胆胺，胆胺经甲基化可变为胆碱。丝氨酸、胆胺及胆

碱分别是合成丝氨酸磷脂、脑磷脂及卵磷脂的原料。但脂类不能转变为氨基酸，仅脂肪的甘油部分可循糖异生途径生成糖，再转变为某些非必需氨基酸。

(四) 某些氨基酸是核苷酸/核酸合成的前体

体内合成嘌呤、嘧啶核苷酸需要氨基酸作为重要原料，核苷酸再进一步合成核酸(RNA、DNA)。如嘌呤的合成需甘氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺及一碳单位；嘧啶的合成需天冬氨酸、谷氨酰胺及一碳单位为原料。合成核苷酸所需的磷酸核糖由磷酸戊糖途径提供。

糖、脂、氨基酸代谢途径间的相互关系见图 9-1。



●图 9-1　糖、脂、氨基酸代谢途径间的相互联系
□中为枢纽性中间代谢物

第三节　体内重要组织、器官的代谢特点及联系

机体各组织、器官由于细胞分化和结构不同，含有与其相应生理功能一致的特定酶系和代谢途径，因而代谢及能源物质的利用各具特点（表 9-1）。但它们涉及 ATP 生成和糖原、脂肪代谢的基本代谢方式又有共同之处。各组织、器官并非各自孤立地进行，而是通过血液循环及神经系统联成统一的整体。

表 9-1　重要器官及组织氧化供能的特点

器官组织	特有的酶	功能	主要代谢途径	主要供能物质	代谢和输出的产物
肝	葡萄糖激酶、葡萄糖-6 磷酸酶、甘油激酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶	代谢枢纽	糖异生、脂酸β-氧化、糖有氧氧化、糖原代谢、酮体生成等	葡萄糖、脂酸、乳酸、甘油、氨基酸	葡萄糖、VLDL、HDL、酮体等
脑		神经中枢	糖有氧氧化、糖酵解、氨基酸代谢	葡萄糖、脂酸、酮体、氨基酸等	乳酸、CO_2、H_2O
心	脂蛋白脂酶，呼吸链丰富	泵出血液	有氧氧化	脂酸、葡萄糖、酮体、VLDL	CO_2、H_2O
脂肪组织	脂蛋白脂酶、激素敏感脂肪酶	储存及动员脂肪	酯化脂酸，脂解	VLDL、CM	游离脂酸、甘油
骨骼肌	脂蛋白脂酶，呼吸链丰富	收缩	有氧氧化、糖酵解	脂酸、葡萄糖、酮体	乳酸、CO_2、H_2O
肾	甘油激酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶	排泄尿液	糖异生、糖酵解、酮体生成	脂酸、葡萄糖、乳酸、甘油	葡萄糖
红细胞	无线粒体	运输氧	糖酵解	葡萄糖	乳酸

一、肝是人体最重要的物质代谢中心和枢纽

从食物消化吸收的所有营养物质进入肝后均先经肝加工再分配到机体各处。肝的耗 O_2 量占全身耗 O_2 量的 20%，在糖、脂、蛋白质、水、盐及维生素代谢中均具有独特而重要的作用（见第十七章）。以糖代谢为例，肝在稳定机体血糖水平方面有重要调节作用。肝合成和储存糖原的相对量最多，可达肝重的 10%，约 150g；肝还有糖异生途径酶系，可使氨基酸、乳酸、甘油等非糖物质转变为糖，以保证机体对糖的需要。此外肝有葡萄糖-6-磷酸酶，可使储存的糖原分解为葡萄糖释放入血以维持血糖含量恒定，而肌则缺乏此酶，因而肌糖原不能降解成葡萄糖。肝几乎是体内合成酮体的唯一器官，也是合成内源性脂肪、胆固醇和蛋白质最多、最活跃的器官。肝通常氧化脂酸供应能量。因此肝是通过糖-脂代谢与肝外组织联系最密切的核心器官。肝几乎是体内合成尿素的唯一器官，氨基酸代谢生成的氨主要以尿素的形式排出体外。

二、心可利用多种能源物质，以有氧氧化为主

心肌持续、节律性收缩，其线粒体极为丰富，需要获得持续供氧。正常优先以脂酸为燃料产生 ATP，还储存有很少量磷酸肌酸和糖原。可依次以消耗自由脂酸、葡萄糖、酮

体等能源物质提供能量，因此即使在能源供给十分缺乏的情况下，仍能保证心不停搏动时ATP的需要。

三、脑主要利用葡萄糖供能且耗氧量大

脑是机体耗能大的主要器官，静息时耗O_2量可占全身耗O_2量的20%。大脑没有糖原及有意义的脂肪、蛋白质储备，几乎以葡萄糖为唯一供能物质。需要持续血流供应其耗用的葡萄糖，每天消耗葡萄糖约100g。长期饥饿血糖供应不足时，脑可转变利用由肝生成的酮体作为重要供能物质以适应环境改变。这样，脑虽然不能直接利用脂酸，但可间接利用体内脂肪代谢中间物作为能源。饥饿3～4天每天耗用约50g酮体，饥饿2周后耗用酮体可达100g。

四、肌肉主要氧化脂肪酸，强烈运动产生大量乳酸

骨骼肌静息时耗O_2量占全身耗O_2量的30%，运动时可高达90%。静息时以氧化脂酸为主以及用葡萄糖和酮体氧化供能，含2%的糖原和一定量的磷酸肌酸。在剧烈运动时，肌所需ATP明显增加，并通过增强肌糖原的无氧酵解提供ATP，糖酵解活性可爆发性增加，使6-磷酸葡萄糖流迅速增高，达2000倍，产生乳酸增加。由于肌缺乏葡萄糖-6-磷酸酶，因此肌糖原不能直接分解成葡萄糖提供血糖。

五、糖酵解是为成熟红细胞提供能量的主要途径

葡萄糖的糖酵解途径是成熟红细胞的主要能量来源。由于红细胞没有线粒体，不能进行糖的有氧氧化，也不能利用脂酸及其他非糖物质，每天消耗15～20g葡萄糖。

六、脂肪组织是合成、储存脂肪的重要组织

作为体内合成及储存脂肪的重要组织，脂肪细胞内脂肪的代谢速率高，平均转换时间仅几天。正常肝合成大部分脂肪，但不储存脂肪，肝细胞内合成的脂肪随即合成VLDL并释放入血，可运输到脂肪组织储存。脂肪细胞还含有激素敏感甘油三酯脂肪酶，能动员储存的脂肪分解成脂酸和甘油释入血循环以供机体其他组织作为能源。

七、肾是可进行糖异生和生成酮体两种代谢的器官

肾是可进行糖异生和生成酮体的器官。正常情况下，肾通过糖异生产生的葡萄糖量少仅占肝糖异生的10%，而饥饿5～6周后由肾异生的葡萄糖达40g/d，与肝糖异生的量几乎相等。肾髓质因无线粒体，主要由糖酵解供能，而肾皮质则主要由脂酸及酮体的有氧氧化供能。

不同组织器官的代谢过程、代谢中间物及代谢终产物，通过血液循环、神经系统及激素的调节联系成为一个统一的整体。

第四节　代谢调节方式

代谢调节是生物的重要特征，也是生物进化过程中逐步形成的一种适应能力，进化程

度愈高的生物其代谢调节方式也愈复杂。单细胞微生物主要通过细胞内代谢物浓度的变化，对酶的活性及含量进行调节。这种调节称为细胞水平代谢调节。进化至高等生物，细胞水平的调节发展得更为精细复杂，出现了专司调节功能的内分泌细胞及内分泌器官，它们通过分泌的激素可对其他细胞发挥代谢调节作用，这种调节称为激素水平的代谢调节。高等动物不仅有完整的内分泌系统，而且还有功能十分复杂的神经系统。在中枢神经系统的控制下，或通过神经纤维及神经递质对靶细胞直接发生影响，或通过分泌某些激素来调节某些靶细胞的代谢和功能，并通过多种激素的互相协调而对机体各组织、器官的代谢进行代谢整合，这种调节称为整体水平的代谢调节。

细胞水平代谢调节、激素水平代谢调节和整体水平代谢调节这三级水平代谢调节中，激素和神经对代谢的调节都是通过细胞水平的代谢调节实现的，因此细胞水平代谢调节是基础，为本章介绍的重点。

一、细胞水平的代谢调节主要调节关键酶活性

（一）细胞酶系有特定细胞和亚细胞区域的隔离分布

细胞是组成组织及器官的最基本功能单位。参与同一代谢途径的酶类常可组成多酶体系，分布于细胞的某一区域或亚细胞结构中。例如糖酵解酶系、糖原合成与分解酶系、脂酸合成酶系均存在胞液中，而三羧酸循环酶系、脂酸β-氧化酶系和氧化磷酸化酶系则分布于线粒体中，而核酸合成酶系绝大部分集中于细胞核内（表 9-2）。

表 9-2 主要代谢途径多酶体系在细胞内的分布

多酶体系	分布	多酶体系	分布
DNA 及 RNA 合成	细胞核	糖酵解	胞液
蛋白质合成	内质网、胞液	戊糖磷酸途径	胞液
糖原合成	胞液	糖异生	胞液
脂酸合成	胞液	脂酸β氧化	线粒体
胆固醇合成	内质网、胞液	多种水解酶	溶酶体
磷脂合成	内质网	三羧酸循环	线粒体
血红素合成	胞液、线粒体	氧化磷酸化	线粒体
尿素合成	胞液、线粒体	呼吸链	线粒体

不同组织细胞有不同代谢酶谱、同工酶谱，使各组织细胞具有各自代谢特点。参与不同代谢途径的相应酶类在不同细胞器的区域化分布，使同一代谢途径一系列酶促反应连续进行，提高反应速率。使各种代谢途径互不干扰，又利于彼此协调，更有利于细胞调节物对各代谢途径的特异调节。各种代谢物也相应在不同亚细胞器或区域隔离分布，直接影响相关代谢的反应速率。

代谢途径包含一系列酶催化的化学反应，其速率和方向是由其中一个或几个具有调节作用的关键酶的活性所决定的。这些能调节代谢的酶称为调节酶（regulatory enzymes）或关键酶（key enzymes）。在代谢途径各反应中，调节酶或关键酶所催化的反应具有下述特点：①反应速度最慢，因此又称为限速酶（rate-limiting enzymes），它的活性决定整个代谢途径的总速度；②常催化单向反应或非平衡反应，因此其活性决定整个代谢途径的方向；③酶活性除受底物控制外，还受多种代谢物或效应剂的调节。调节某些

关键酶或调节酶的活性是细胞代谢调节的一种重要方式。表 9-3 列出一些重要代谢途径的关键酶。

表 9-3 某些重要代谢途径的关键酶

代谢途径	关键酶
糖原降解	磷酸化酶
糖原合成	糖原合酶
糖酵解	己糖激酶
	磷酸果糖激酶-1
	丙酮酸激酶
糖有氧化	丙酮酸脱氢酶系
	柠檬酸合酶
	异柠檬酸脱氢酶
糖异生	丙酮酸羧化酶
	磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶
	果糖双磷酸酶-1
脂酸合成	乙酰辅酶 A 羧化酶
胆固醇合成	HMG 辅酶 A 还原酶

细胞水平的代谢调节主要是通过对关键酶活性的调节实现的。对关键酶的调节方式可分两类，一类是通过改变酶的分子结构，从而改变细胞已有酶的活性来调节酶促反应的速率。此类又分为变构调节和化学修饰调节两种。该类调节作用较快，在数秒及数分钟内即可发生，又称为快速调节。另一类则是通过调节酶蛋白分子的合成或降解以改变细胞内酶的含量来调节酶促反应速率。这类调节一般需数小时或几天才能实现，因此称为迟缓调节。

（二）小分子代谢物改变关键酶构象对酶活性变构调节

1. 代谢途径关键酶多数受到变构调节 酶变构调节的概念和作用机制在第五章酶的调节中已经讨论。内源、外源性小分子化合物作为变构效应剂可与酶蛋白分子活性中心以外的某一部位特异结合，引起酶蛋白分子构象变化、从而改变酶的活性。这种调节称为酶的变构调节（allosteric regulation）或别构调节。“allo”意为有别于底物结合位点的调节部位。别位调节在生物界普遍存在。代谢途径中的关键酶大多是变构酶。现将某些代谢途径中的变构酶及其变构效应剂列于表 9-4。

表 9-4 一些代谢途径中的变构酶及其变构效应剂

代谢途径	变构酶	变构激活剂	变构抑制剂
糖酵解	己糖激酶	AMP、ADP、FDP、Pi	G-6-P
	磷酸果糖激酶-1	FDP	柠檬酸
	丙酮酸激酶		ATP 乙酰 CoA
三羧酸循环	柠檬酸合酶	AMP	ATP、长链脂酰 CoA
	异柠檬酸脱氢酶	AMP、ADP	ATP
糖异生	丙酮酸羧化酶	乙酰 CoA、ATP	AMP
糖原分解	磷酸化酶 b	AMP、G-1-P、Pi	ATP、G-6-P
脂酸合成	乙酰辅酶 A 羧化酶	柠檬酸、异柠檬酸	长链脂酰 CoA
氨基酸代谢	谷氨酸脱氢酶	ADP、亮氨酸、甲硫氨酸	GTP、ATP、NADH
嘌呤合成	谷氨酰胺 PRPP 酰胺转移酶		AMP、GMP
嘧啶合成	天冬氨酸转甲酰酶		CTP、UTP
核酸合成	脱氧胸苷激酶	dCTP、dATP	dTTP

变构效应剂可以是酶体系的终产物或其他小分子代谢物。它们在细胞内浓度的改变能灵敏地反映代谢途径的强度和能量供求情况，并使关键酶构象改变，影响酶活性，从而调节代谢的强度、方向以及细胞能量的供需平衡。如 ATP 和柠檬酸是糖酵解途径关键酶 6-

磷酸果糖激酶-1 的变构抑制剂，两种物质增加时，可抑制糖氧化途径。而 ADP、AMP 是该酶变构激活剂，其增多可以促进葡萄糖氧化，增加 ATP 产生。

变构效应剂引起酶分子构象的改变，有的表现为亚基的聚合、解聚，如果糖 2，6-二磷酸（FBP）对 6-磷酸果糖激酶-1 的变构激活或解聚，而 ATP 对磷酸果糖激酶-1 的变构抑制或聚合。有的是原聚体与多聚体相互转化从而引起酶活性的改变，如乙酰辅酶 A 羧化酶是由 4 种不同亚基构成的原聚体，无活性，当它与别位激活剂柠檬酸或异柠檬酸结合后，由 10～20 个原聚体聚合成多聚体，呈纤维状，且活性增加 10～20 倍。ATP-Mg^{2+} 可使多聚体解聚为原聚体而使酶失活。

2. 代谢途径的起始物或产物通过变构调节影响代谢途径　代谢途径终产物常可使催化该途径起始反应的酶受到抑制，这类抑制多为变构抑制（allosteric inhibition）。例如长链脂酰辅酶 A 可反馈性抑制乙酰辅酶 A 羧化酶，从而抑制脂酸的合成。这样可使代谢物的生成不致过多。变构调节还可使能量得以有效利用，不致浪费。例如 G-6 P 抑制糖原磷酸化酶以阻断磷酸葡萄糖进入糖酵解和糖的氧化途径，使 ATP 不致产生过多，同时 G-6-P 又激活糖原合酶，使多余的磷酸葡萄糖合成糖原，能量得以有效储存。又如 ATP 可别位抑制 6 磷酸果糖激酶-1、丙酮酸激酶和柠檬酸合酶阻断糖酵解、有氧氧化及三羧酸循环，使 ATP 的生成不致过多，造成浪费。在变构调节中，变构抑制更为多见，防止过量生成多余产物的浪费和对机体可能的损害。变构调节还可使不同代谢途径相互协调，例如柠檬酸既可变构抑制磷酸果糖激酶，又可变构激活乙酰辅酶 A 羧化酶，使多余的乙酰辅酶 A 合成脂酸。

（三）关键酶活性可由酶的化学修饰调节

1. 通过对酶蛋白的化学修饰调节代谢途径关键酶活性　酶蛋白肽链上某些残基在不同催化单向反应的酶的催化下发生可逆的共价修饰（covalent modification），从而引起酶活性改变，这种调节称为酶的化学修饰（chemical modification）调节又称共价修饰调节。特异催化酶共价修饰反应的酶称为转化物酶（converter enzymes）。酶的共价修饰主要有磷酸化与脱磷酸化，乙酰化与脱乙酰化，甲基化与去甲基化，腺苷化与脱腺苷化及—SH 与—S—S—互变等，其中磷酸化与脱磷酸化在代谢调节中最为多见（表 9-5）。

表 9-5　酶促化学修饰对酶活性的调节

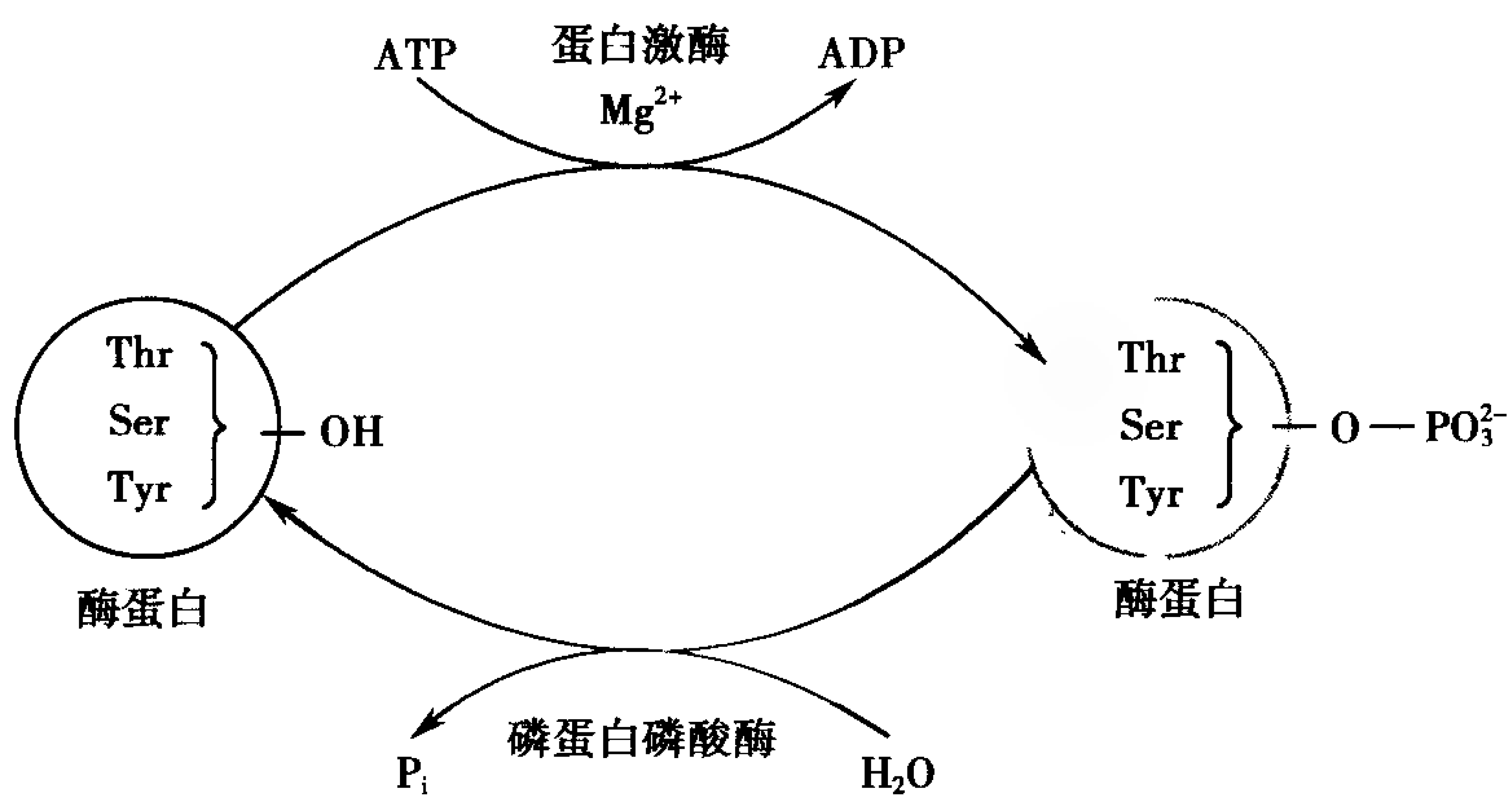
酶	化学修饰类型	酶活性改变
糖原磷酸化酶	磷酸化/脱磷酸	激活/抑制
磷酸化酶 b 激酶	磷酸化/脱磷酸	激活/抑制
糖原合酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
丙酮酸脱羧酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
磷酸果糖激酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
丙酮酸脱氢酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
HMG-CoA 还原酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
HMG-CoA 还原酶激酶	磷酸化/脱磷酸	激活/抑制
乙酰 CoA 羧化酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
脂肪细胞甘油三酯脂肪酶	磷酸化/脱磷酸	激活/抑制
黄嘌呤氧化脱氢酶	—SH/—S—S—	脱氢酶/氧化酶

由特异酶催化的共价修饰是体内快速调节酶活性的另一种重要方式，磷酸化是最常见

的修饰方式。酶蛋白分子中丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的羟基是磷酸化修饰的位点。酶蛋白的磷酸化是在蛋白激酶（protein kinase）的催化下，由 ATP 提供磷酸基及能量完成的，而脱磷酸则是由磷蛋白磷酸酶（protein phosphatase）催化的水解反应。因此，酶的磷酸化与脱磷酸这对相反过程，分别由蛋白激酶及磷蛋白磷酸酶催化的反应完成，它们均属于转化物酶（图 9-2）。

E. Fischer 和 E. Krebs 揭示了可逆性的蛋白质磷酸化过程

1992 年度的诺贝尔生理学奖授予给了 E. Fischer 和 E. Krebs。他们的重大成就是发现可逆性的蛋白质磷酸化过程是生物的自身调节机制，细胞内物质的不平衡可导致疾病的发生。他们第一次提纯出了磷酸酯酶，可以使一种酶去磷酸化，进而再激活一系列生化反应。他们的发现使蛋白质可逆磷酸化及其有关的第二信使调控、蛋白激酶和磷酸酯酶的研究成为当代生物化学和医学研究的一个最活跃、最吸引人的研究领域之一。对现代生物化学和现代医学具有重要意义。



● 图 9-2　酶的磷酸化与脱磷酸

2. 酶促化学修饰的特点　①绝大多数属于这类调节方式的关键酶都具无活性（或低活性）和有活性（或高活性）两种形式，分别具有不同的化学基团的共价修饰状态。两种形式之间通过两种不同转换酶的催化可以互相转变。催化互变反应的转换酶在体内又受上游调节因素如激素的控制。②和变构调节不同，化学修饰中关键酶的共价键变化是酶催化的反应，迅速发生且有多级酶促级联，故有放大效应，调节效率常较变构调节高。③磷酸化与脱磷酸是最常见的酶促化学修饰反应。酶的 1 分子亚基发生磷酸化常需消耗 1 分子 ATP，这与合成同效的酶蛋白消耗的 ATP 相比显然要少得多，是细胞经济有效的调节酶活性方式。

变构调节与化学修饰调节只是调节酶活性的两种不同方式，机体某些重要的关键酶可同时有这两种方式的调节，相互补充，使相应代谢途径调节更为精细、有效。例如对糖原分解途径的调节中，磷酸化酶 b 既可受 AMP、Pi 的变构激活和 ATP、G-6-P 的变构抑制，又可通过磷酸化酶 b 激酶的磷酸化化学修饰而被激活，或受磷蛋白磷酸酶的脱磷酸作用而失活。类似的例子还很多。变构调节是细胞的一种基本调节机制，对维持细胞代谢物和能量平衡具有重要作用。然而当效应剂浓度过低，不足与酶分子全部调节亚基或部位结合时，就不能使所有酶发挥作用，故难以应急。在应激情况下，少量激素的释放，即可通过

一系列级联酶促化学修饰反应，迅速引起关键酶活性的级联放大及生理效应，以适应应激的需要。细胞内同一酶可受这两种调节方式双重调节，两者相辅相成，对细胞水平代谢调节的顺利进行及内环境的稳定具有重要意义。

（四）改变细胞内酶的含量可调节酶的活性

酶活性的快速调节通过调节细胞内原有酶的活性实现，调节酶活性的另一重要机制是通过改变酶的合成或降解速率以调节细胞内酶的含量及总反应活性，来调节代谢的速率和强度。由于酶的合成或降解所需时间较长，消耗 ATP 量较多，通常要数小时甚至更长，因此酶含量调节属迟缓调节。

1. 调节酶蛋白含量可通过诱导或阻遏酶蛋白基因的表达　一般将增加酶合成的化合物称为酶的诱导剂（inducer），减少酶合成的化合物称为酶的阻遏剂（repressor），可影响酶含量的化合物包括酶的底物、产物、激素或药物等。诱导剂或阻遏剂是通过影响酶蛋白生物合成的转录或翻译过程发挥作用，但常见方式是调节转录。

底物对酶合成的诱导和阻遏普遍存在。高等动物体内，因有激素的调节，底物诱导作用不如微生物体内重要。例如尿素合成循环的酶可受食入蛋白质增多而诱导其合成增加。鼠饲料中蛋白质含量增加，可诱导鼠肝精氨酸酶使其活性增加。

代谢反应的产物除可变构抑制或反馈抑制关键酶或催化起始反应酶的活性外，还可阻遏这些酶的合成。例如 HMG-CoA 还原酶是胆固醇合成的关键酶，胆固醇可阻遏肝中该酶的合成。但肠黏膜中胆固醇的合成不受胆固醇的影响，因此摄取高胆固醇食物后，血胆固醇仍有升高的危险。

激素诱导酶表达是常见方式，例如糖皮质激素能诱导一些氨基酸分解酶和糖异生关键酶的合成，而胰岛素则能诱导糖酵解和脂酸合成途径中关键酶的合成。很多药物和毒物可促进肝细胞微粒体中单加氧酶（或称混合功能氧化酶）或其他一些药物代谢酶的诱导合成，从而使药物失活，具有解毒作用。但也可引起细胞的耐药性。

2. 调节细胞酶含量也可通过改变酶蛋白降解速度　合成的酶蛋白可被降解失活，改变酶蛋白分子的降解速率也能调节细胞内酶的含量。细胞内蛋白质的降解有两条途径，溶酶体（lysosome）蛋白水解酶可非特异降解酶蛋白，细胞对酶蛋白特异降解需要依赖 ATP 的泛素-蛋白酶体（proteosome）途径（详见第七章）。某些因素如能改变或影响这两种蛋白质降解体系，可间接影响酶蛋白的降解速度，调节代谢。

二、激素通过作用特异受体调节代谢过程

高等动物通过激素的代谢信号来调控体内的物质代谢，称为激素水平的代谢调节。激素作用的一个重要特点是不同激素作用于不同组织产生不同的生物效应，表现较高的组织特异性和效应特异性。激素作用的特定组织或细胞（即靶组织或靶细胞）存在有能特异识别和结合相应激素的受体（receptor）。当激素与靶细胞受体结合后，能将激素的调节信号，跨膜传递入细胞内，并触发细胞内一系列信号转导反应过程，最终表现出激素的生物学效应。按激素受体在细胞的部位不同，可将激素分为两大类：

1. 膜受体激素信号通过跨膜受体传递调节细胞代谢　膜受体是细胞表面质膜上的跨膜糖蛋白。这类激素包括胰岛素、生长激素、促性腺激素、促甲状腺激素和甲状旁腺素等蛋白质类激素，生长因子等肽类及肾上腺素等儿茶酚胺类激素。这些亲水性激素分子不能直接透过脂双层的细胞表面质膜传递信号，而是作为第一信使分子与相应的靶细胞膜受体结合后，由受体将激素的调节信号跨膜传递到细胞内。可以通过第二信使（如 cAMP）及信号蛋白的级联放大，产生显著细胞代谢效应（详见第十五章）。

E. W. Sutherland 发现 cAMP 作为激素作用的第二信使

美国科学家 E. W. Sutherland 因发现并分离出 cAMP（环腺苷一磷酸），以及激素调节作用的机制而获 1971 年诺贝尔生理医学奖。E. W. Sutherland 主要从事与糖代谢有关的酶和激素的研究。他发现并分离出环腺苷一磷酸（cAMP），确定了它的结构，并提出 cAMP 行使"第二信使"作用的途径。他的工作从分子水平阐明了激素作用的机制。目前已知，激素结合细胞触发的一系列反应称为信号转导（signal transduction），而这些后续的研究都以 E. W. Sutherland 发现激素的作用机制为基础。而环核苷酸研究已成为生物化学研究的专门领域。

2. 激素-胞内受体复合物可影响基因转录，调节细胞代谢 类固醇激素、甲状腺素，1,25（OH)$_2$-维生素 D_3 及视黄酸等脂溶性激素，可透过磷脂双层细胞质膜进入细胞，与相应的胞内受体结合。大部分激素与位于细胞核内的受体结合，有的激素与胞液中受体结合后再进入核内，引起受体构象改变，然后激素受体复合物形成二聚体，再与 DNA 的特定序列称激素反应元件（hormone response element，HRE）结合，促进（或抑制）相应的基因转录，进而促进（或阻遏）蛋白质或酶的合成，调节细胞内酶的含量，从而对细胞代谢进行调节。

三、机体通过神经系统及神经-体液途径整体调节体内物质代谢

代谢的整体调节是指机体在神经系统的主导下，通过神经 体液途径直接调控所有细胞水平和激素水平的调节方式，使不同组织、器官中物质代谢途径相互协调和整合，以适应环境的变化，维持内环境的相对恒定。代谢整合主要意义是整合、调动、协调机体所有组织的能量代谢途径，维持血液中燃料物质的持续可利用性，即热量平衡（caloric homeostasis）。现以饥饿及应激状态下物质代谢的整体调节为例，说明整体调节的重要意义。

（一）糖、脂和蛋白质代谢在不同饥饿状态有不同改变

正常成人通过三大营养物质的氧化提供维持生命活动能量需要。在病理状态（如昏迷、食管及幽门梗阻等）或特殊情况下不能进食时若不能及时治疗或补充食物，机体在整体水平调节物质代谢，发生一系列的变化，以调整供能物质的组成，减少葡萄糖作为燃料的消耗。因为机体始终需要最低限量、必需的葡萄糖供应，如中枢神经系统、红细胞依赖血糖持续供应，肝外需要少量糖以产生草酰乙酸维持三羧酸循环以及为脂肪组织等转化提供 3-磷酸甘油等。

1. 短期饥饿时脂肪动员增加而减少糖的利用 禁食 24 小时，肝、肌糖原接近耗竭，血糖浓度趋于降低，直至不能进食 1～3 天，这引起胰岛素分泌减少和胰高血糖素分泌增加，并引起一系列的代谢改变。

（1）脂肪动员加强，酮体生成增多：激素信号使脂肪较早被动员，血浆甘油和游离脂酸含量升高，脂酸成为肝、脂肪组织的基本能源。由于草酰乙酸等三羧酸循环中间物被消耗用于糖异生，脂酸氧化生成的大量乙酰 CoA 进入三羧酸循环，氧化受阻积聚，转而生成酮体。脂肪组织动员出的脂酸约 25%在肝生成酮体。此时脂酸和酮体成为心肌、骨骼肌和肾皮质的重要燃料，一部分酮体可被大脑利用。这使上述组织对葡萄糖摄取、利用降低。利用酮体供能是组织适应饥饿环境的主要代谢改变。饥饿时脑对葡萄糖利用也有减

少，但饥饿初期的大脑仍主要由葡萄糖供能。

（2）糖异生作用增强：饥饿两天后，肝糖异生和酮体生成明显增加，且肝降解一定量蛋白质用于糖异生。此时肝糖异生速度约为150g葡萄糖/d，其中30%来自乳酸，10%来自甘油，其余40%来自氨基酸。肝是饥饿初期糖异生的主要场所，约占80%，小部分（约20%）则在肾皮质中进行。

（3）肌蛋白质分解增加：蛋白质分解增加出现较迟，造成释放入血的氨基酸量增加，肌蛋白质分解的氨基酸大部分转变为丙氨酸和谷氨酰胺释放入血循环，进入肝后作为氧化供能及糖异生原料。饥饿第3天，肌释出丙氨酸占输出总氨基酸的30%～40%。

总之，饥饿时动员的储存蛋白质和脂肪成为主要能源，其中脂肪约占能量来源的85%以上。如及时输入葡萄糖补充能源，可减少酮体的生成，降低酸中毒的发生率，且可防止体内蛋白质的消耗。每输入100g葡萄糖约可减少50g组织蛋白的消耗，这对不能进食的消耗性疾病患者临床处理更为重要。

2. 长期饥饿时各组织发生与短期饥饿不同的代谢改变 为适应长期饥饿环境条件，脂肪动员进一步加强，肝生成大量酮体，脑组织利用酮体增加，超过葡萄糖，占总耗氧量的60%，以节约对组织蛋白的消耗。肌利用脂酸为主要能源，以保证酮体优先供应脑组织。因蛋白质持续分解会危及生命，此时肌蛋白分解下降，肌释出氨基酸减少，负氮平衡有所改善。乳酸和丙酮酸成为肝糖异生的主要来源。饥饿晚期肾糖异生作用明显增强，生成约40g葡萄糖/d，几乎和肝相等。据理论计算，正常成人脂肪储备在饥饿时可维持3个月基本代谢能量需要，但饥饿时不能只靠氧化脂肪存活，因为同时机体大量非必需氨基酸消耗，过量酮体的生成聚积，缺乏维生素、矿物质和蛋白补充，可危及生命。

（二）应激增加糖、脂和蛋白质分解的能源供应，限制能源存积

动物经应激（stress）信号刺激时，交感神经兴奋，肾上腺髓质及皮质激素分泌增多，血浆胰高血糖素及生长激素水平增加，而胰岛素分泌减少，引起一系列生理、代谢改变。结果使氧摄入增多，并增加能源供应，限制能源存积。

1. 血糖升高 肾上腺素及胰高血糖素分泌增加，均可激活磷酸化酶促进肝糖原分解，抑制糖原合成。同时肾上腺皮质激素及胰高血糖素又可使糖异生加强，不断补充血糖，加上肾上腺皮质激素及生长素使周围组织对糖的利用降低，这些共同作用引起血糖升高。这对保证大脑、红细胞的供能有重要意义。

2. 脂肪动员增强 血浆游离脂酸升高，成为心肌、骨骼肌及肾等组织主要能量来源。

3. 蛋白质分解加强 肌释出丙氨酸等氨基酸增加，同时尿素生成及尿氮排出增加，呈负氮平衡。

总之，应激时糖、脂、蛋白质代谢特点是分解代谢增强，合成代谢受到抑制。血液中分解代谢中间产物如葡萄糖、氨基酸、游离脂酸、甘油、乳酸、酮体以及尿素等含量增加。应激时，机体代谢改变见表9-6。

（三）肥胖是多种因素引起的食欲和能量调节紊乱引起的疾病

1. 肥胖者增加脂肪储存有不同类型 目前，人群中肥胖率持续增长，成为严重影响人类健康、生活的问题。肥胖是一种由食欲和能量调节紊乱引起的疾病，与遗传、环境、膳食结构及体力活动等多种因素有关，其发病过程复杂，可继发多种疾病，危害严重。目前将以肥胖、高血压、糖代谢及血脂异常等为主要临床表现的症候群称为代谢综合征（metabolic syndrome，MS），2005年国际糖尿病联盟将代谢综合征定义为：以中心性肥胖为核心，合并血压、血糖、甘油三酯升高和（或）HDL胆固醇降低的疾病。其表现为：心、脑血管病的多种代谢危险因素在同一个体内集结的状态。而超重和肥胖在MS发生、发展中起着决定性的作用。

表 9-6　应激时机体的代谢改变

内分泌腺或组织	代谢改变	血中含量
胰腺 α-细胞	胰高血糖素分泌增加	胰高血糖素↑
β-细胞	胰岛素分泌抑制	胰岛素↓
肾上腺髓质	去甲肾上腺素及肾上腺素分泌增加	肾上腺素↑
皮质	皮质醇分泌增加	皮质醇↑
肝	糖原分解增加	葡萄糖↑
	糖原合成减少	
	糖异生增强	
	脂酸β氧化增加	
	酮体生成增加	酮体↑
肌	糖原分解增加	乳酸↑
	葡萄糖的摄取利用减少	葡萄糖↑
	蛋白质分解增加	氨基酸↑
	脂酸β-氧化增强	
脂肪组织	脂肪分解增强	游离脂酸↑
	葡萄糖摄取及利用减少	甘油↑
	脂肪合成减少	

肥胖诊断可有不同方法，如身高、标准体重和腰围等，而常用标准是体重指数（body mass index，BMI，BMI＝体重（kg）/身高的平方（m^2）。如体重超过标准体重的20％或体重指数＞30即为肥胖。

2. 正常食欲、进食和能量消耗的平衡受到神经、内分泌系统的复杂调节　人体通过复杂的神经内分泌系统调节正常食欲和进食行为，进而调节体重，这涉及胃、肝、胰腺、脂肪组织及消化道分泌的多种激素。调节食欲和进食的激素可分为两类，短期调节激素主要调节具体进食行为，而长期调节激素作用是稳定机体脂肪储存水平。

短期进食调节激素主要包括生长激素释放肽（growth hormone-releasing peptide）和胆囊收缩素（cholecystokinin，CCK）。生长激素释放肽为含28个氨基酸残基的肽类激素，有刺激食欲功能，由胃黏膜细胞分泌，当胃排空时产生最多，而食物被耗尽时其水平迅速下降。CCK是进食时小肠上段细胞分泌的肽类激素，可引起厌腻、饱胀感，趋于终止进食。参与食欲、进食长期调节的激素包括胰岛素和瘦蛋白（leptin），两者都有抑制进食并促进能量消耗，维持体重及热量平衡的功用。

3. 肥胖者常表现胰岛素分泌、功能异常和糖脂代谢的紊乱　肥胖发生重要原因包括进食热量过多、进食糖量过多及体力活动过少，这三者都可引起胰岛素分泌增加，造成高胰岛素血症。高胰岛素血症是肥胖的重要特征，也是促进肥胖形成的重要因素。肥胖者常可表现胰岛素抵抗和高胰岛素血症，但发生机制仍不清楚。胰岛素在肥胖形成的不同时期有不同表现。在早期即肥胖形成期，靶细胞对胰岛素保持正常敏感性，所有靶组织均受胰岛素的刺激，血浆胰岛素水平升高，血糖降低，糖耐量正常，对胰岛素没有抵抗。在后期，又称为肥胖稳定期，此期高胰岛素血症持续存在，外围组织对胰岛素敏感性降低，胰岛素代偿性分泌增加，表现糖耐量下降、高胰岛素血症。随病情进展，组织可对胰岛素不发生反应，发生胰岛素抵抗，血糖正常或升高，耐糖量常降低。

胰岛素是调节糖、脂肪代谢的重要激素，同时对血压调控、血管收缩反应等有重要作用。如肥胖引起胰岛素抵抗和代偿性高胰岛素血症，进而可导致糖耐量异常、血脂异常以及高血压、血管功能失调，最终发生代谢综合征。与正常人比较，肥胖者有明显的糖、脂代谢的紊乱。

肥胖者糖代谢表现异常。胰岛素分泌受血糖调节，在肥胖形成活跃期，进食后大量糖类食物的吸收，引起血糖增高，刺激血浆胰岛素水平升高，糖耐量先增强，口服或静脉注射葡萄糖后，释出的胰岛素较正常人多；随着肥胖程度的增加和时间的延长，出现糖耐量下降。肌组织对葡萄糖的摄取减少，氧化降低；空腹血浆胰岛素水平升高，外周组织对胰岛素的敏感性降低，逐渐产生胰岛素抵抗。肥胖者也存在脂代谢异常。正常胰岛素抑制脂肪细胞脂肪的动员，促进脂肪酸再合成脂肪。由于发生对胰岛素抵抗，脂肪细胞脂解作用增强及再酯化形成甘油三酯作用减弱，空腹血浆 FFA 升高。肝摄取血中 FFA 增加，使肝内甘油三酯的合成和释出 VLDL 均增多，血甘油三酯升高，可引起脂肪在肌肉、心部位异位积聚。肥胖时摄入热量过多，促进胆固醇合成增加，且脂蛋白代谢异常，使血浆胆固醇常升高。肥胖者血浆生长激素分泌降低，使脂肪的动员减少。

四、代谢组学是对低分子量代谢物集合的整体水平研究

（一）代谢组学定量分析某一生物或细胞所有相对低分子质量代谢产物

代谢组（metabolome）通常是指某一生物或细胞中所有低分子质量代谢产物（metabolite），而不是全部代谢物。代谢组学（metabolomics）是指对某一生物或细胞所有低分子质量代谢产物进行定性和定量检测，分析活细胞中代谢物谱变化的研究领域。通过定量检测生物体在病理生理刺激和基因变异条件下随时间、多参数的代谢应答变化，可获得机体整体性代谢图谱，用以研究基因功能、调控机制。

代谢物是基因表达和代谢过程形成的中间产物和最终产物。各种生理、病理、药理因素对机体的影响必然最终反映在代谢物谱的改变中。代谢组学分析提供的信息比其他组学更接近生物的表现型或生理状态。代谢组学研究的基本内容是高通量测定代谢物变化，研究生物体生化成分谱和功能调节，应用获得的代谢物谱信息通过统计分析阐明相应内在的联系。代谢组学研究的生物标本包括血液、尿液等生物体液、细胞提取物、细胞培养液和组织等。

（二）代谢组学研究需要高通量定量检测技术和大规模的计算

代谢组学研究有样品预处理、数据采集和数据分析解释三个阶段，以高通量的检测实验和大规模的计算为特征。代谢组成分的化学结构、性质复杂多样，需要多种现代分析技术分析。如化合物分离可采用气相色谱（GC）、高效液相色谱（HPLC）、毛细管电泳等；现代检测鉴定技术包括光谱、飞行时间 质谱（TOF MS）、核磁共振（NMR）、电化学等。此外紫外吸收、荧光散射、发射性检测、光散射等分离分析手段及其组合都应用于代谢组学的研究中。如采用 GC MS 和 NMR 技术联用或 HPLC 和 LC/TOF MS 技术联用，可以同时检测出数百种化合物。数据分析涉及生物信息学、化学信息学、化学计量学、计算生物学等。

（三）代谢组学在疾病诊断和新药开发等方面具有应用潜力

通过比较生理与病理状态下代谢组学改变，可发现与疾病相关的有价值的代谢组模式和生物标志物，用于疾病的诊断。Brindle 等应用^{1}H-NMR 技术，对几十例心血管疾病患者血清进行代谢组学分析，结合多种模式识别技术建立了判别心血管疾病及其严重程度的

新诊断方法。该方法的灵敏度及专一性高于90%，仅需几滴血液，就可利用核磁共振指纹谱和计算机模式识别技术，判断出心脏病的严重程度，优于传统的血管造影术。通过比较患者和正常血清、尿代谢组图谱，已经发现卵巢上皮癌、乳腺癌、肝癌和脑膜炎等疾病有其特异的代谢组模式。

代谢组学研究将广泛用于药物靶点、新药开发、毒理学研究、疾病的预防和诊断等更多领域。同时，分析系统的硬件、软件技术将不断提高，向整合化、自动化和高通量的方向发展。

小　　结

体内各种物质代谢相互联系并相互制约。体内物质代谢的特点：①整体性；②在精细调节下进行；③各组织器官物质代谢各具特征；④代谢物具共同的代谢池；⑤能量生成和消耗以 ATP 为中心；⑥NADPH 提供代谢所需的还原当量。各代谢途径之间可通过共同枢纽性中间产物互相联系和转变。糖、脂肪、蛋白质等作为能源物质在供应能量上可互相代替，互相制约，但不能完全互相转变。各组织、器官有独特的代谢方式以完成特定功能。肝是各种物质代谢的中心和枢纽。

机体存在三级水平的代谢调节，包括细胞水平调节、激素水平调节和以中枢神经系统为主导的整体水平调节。细胞水平调节主要通过调节关键酶的活性实现，其中通过改变现有酶分子的结构调节酶活性的方式，发生较快。也可通过改变酶的含量影响酶活性，调节缓慢而持久。对酶结构调节包括酶的变构调节及酶蛋白的化学修饰调节。对物质代谢和某些关键酶，两种调节各有作用、相辅相成。

激素水平调节中，激素与靶细胞受体特异结合，将代谢信号转化为细胞内一系列信号转导级联过程，最终表现出激素的生物学效应。激素可分为膜受体激素及胞内受体激素。前者为蛋白质、多肽及儿茶酚胺类激素，具亲水性，需结合膜受体才能将信号跨膜传递入细胞内。后者为疏水性激素，可透过细胞膜与胞内受体（大多在核内）结合，形成二聚体，作为转录因子与 DNA 上特定激素反应元件（HRE）结合，以调控该元件调控的特定基因的表达。

整体调节是指神经系统通过内分泌腺间接调节代谢和直接影响组织、器官以调节代谢的方式，使机体代谢相对稳定，适应环境改变。饥饿及应激时通过改变多种激素分泌，整体调节引起体内物质代谢的改变。正常食欲、进食和能量消耗的平衡受到神经、内分泌系统复杂调节，肥胖的代谢改变是多种因素引起的整体代谢调节紊乱的病理状态。胰岛素和脂肪细胞分泌的瘦蛋白是调节体内脂肪储存量两种最主要的信号分子。

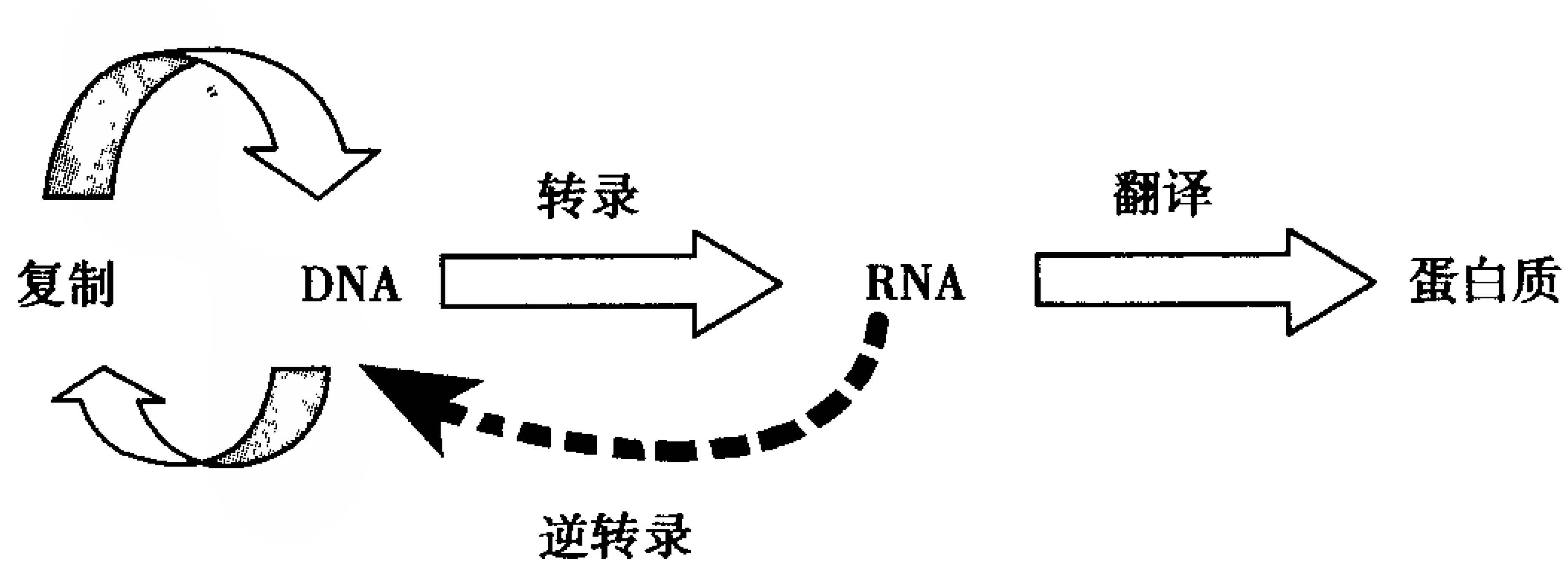
代谢组学是一门较新的组学领域，通过对某一生物或细胞所有低分子质量代谢产物进行定性和定量分析，检测活细胞中整体性代谢物变化。以高通量的检测实验和大规模的计算为特征，代谢物组学在疾病诊断和新药开发等方面具有应用潜力。

（崔　行）

第三篇 基因信息的传递

本篇重点讨论基因信息的传递。包括 DNA 的生物合成（复制）、RNA 的生物合成（转录）、蛋白质的生物合成（翻译）、基因表达调控以及基因重组与基因工程，共五章。

从生物化学意义上说，基因（gene）是为生物活性产物编码的 DNA 功能片断，这些产物主要是蛋白质或是各种 RNA。蛋白质是生命活动的执行者。通过基因转录和翻译，由 DNA 决定蛋白质的一级结构，从而决定蛋白质的功能。DNA 还通过复制，将基因信息代代相传。1958 年，DNA 双螺旋的发现人之一 F. Crick 把上述遗传信息的传递方式归纳为中心法则（the central dogma）：



虚线部分是 1970 年 H. Temin 发现逆转录现象后对中心法则的补充内容。最初提出的中心法则认为：DNA 兼备储存信息和表达的功能，处于生命活动的中心。逆转录现象的发现表明：少数 RNA 也是遗传信息的携带者。最近又发现 RNA 有催化功能，因此有学者提出 RNA 分子才是处于生命活动中心位置的物质。但是这种对传统中心法则的挑战，并不影响中心法则在分子水平上对遗传、代谢类型、生长发育、进化、生命起源、免疫等生命科学关键问题研究的指导地位。

本篇以中心法则为基本线索，依次分章讨论复制(replication)、转录(transcription)和翻译(translation)。每章都先介绍基本概念和所需的酶及各种因素作用。复制、转录、翻译都可按起始、延长和终止三个阶段论述。然后各章均讨论一些相关的生化、医学问题。原核生物和真核生物在基因信息传递中各有特点,但现有知识大多数是原核生物研究的结果。

本篇还介绍基因表达调控和基因工程。基因表达指通过转录和翻译，将 DNA 分子上 A，G，C，T 四种符号所包含的序列信息，转变蛋白质分子上 20 种氨基酸的序列信息。生物越高等，基因信息量也越大。人类基因组（genome）已知由 3×10^9 bp（base pairs，碱基对）的 DNA 组成；约含 4 万个基因。细胞内有一套复杂、精细的调控机制控制着基因表达的时空特性。这是生命科学上重要的研究课题。目前基因表达调控在原核生物转录水平上了解得相当透彻，真核生物基因表达调控研究尚处于资料积累的阶段。基因工程是 20 世纪 70 年代出现的新兴技术。可以预料，基因工程、基因诊断和基因治疗等将为 21 世纪的医学带来革命性的变化，这三方面都涉及基因及其表达的规律。有关基因诊断、基因治疗的知识将在第四篇中介绍。

在学习本篇内容时，要注重掌握基因信息传递各过程的基本特性；参与的成分及重要酶；原核生物与真核生物特点的比较；基因表达的基本原理和有关基因工程的基本概念等。本篇的各章内容之间有着密切关联，因此学习时要善于对比、联系。

第十章　DNA 的生物合成

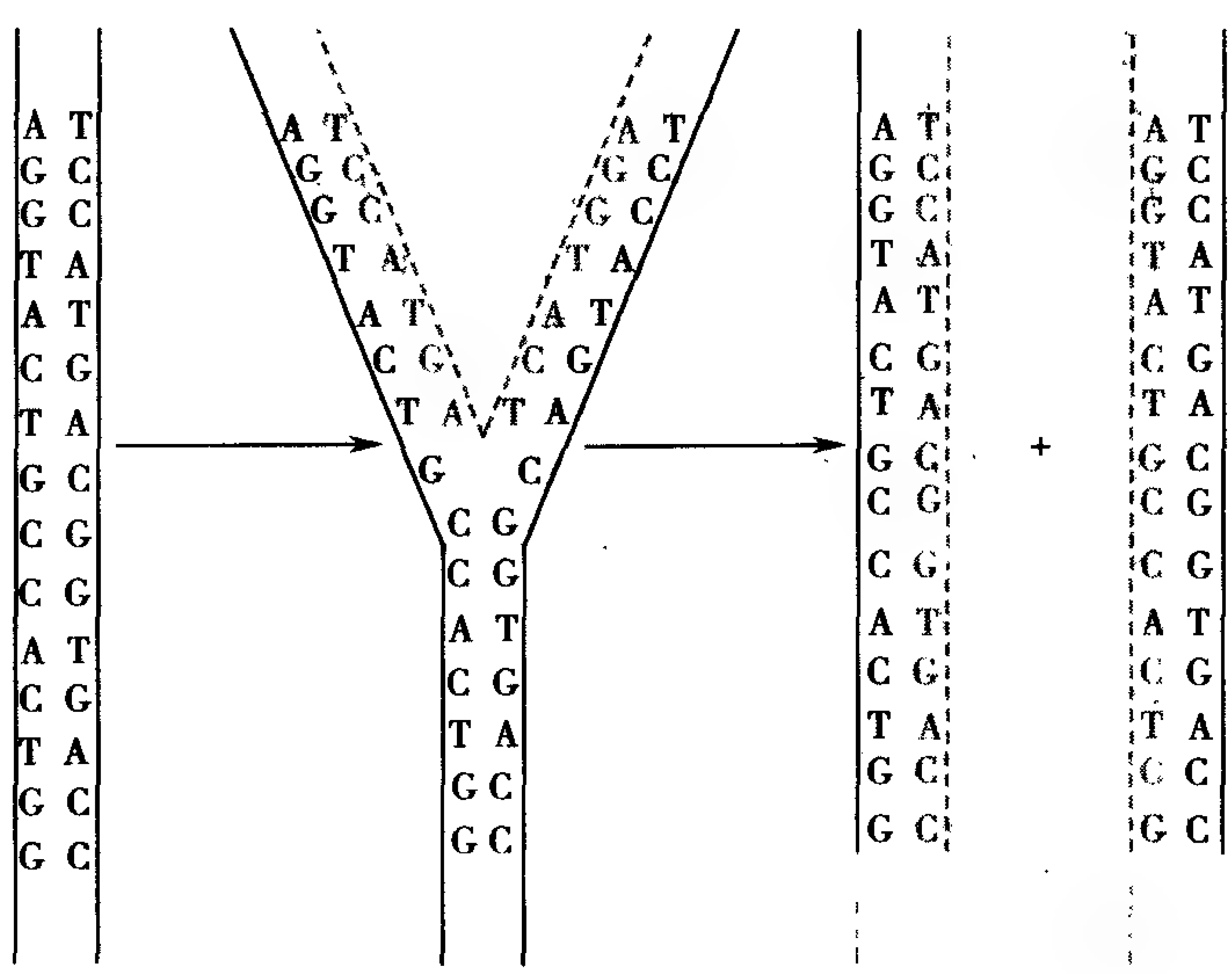
复制（replication）是指遗传物质的传代，以母链 DNA 为模板合成子链 DNA 的过程。碱基配对规律和 DNA 双螺旋结构是复制的分子基础，其化学本质是酶促的生物细胞内单核苷酸聚合。各种酶和蛋白质因子的参与是聚合能够迅速、准确地完成的保证。原核生物和真核生物 DNA 复制过程原则上是相同的，但具体细节上有差别。为便于理解，通常把复制过程分为起始、延长、终止三个阶段来描述。本章还将讨论 RNA 病毒的复制形式，即逆转录；与复制相关的 DNA 损伤、修复现象等。

第一节　复制的基本规律

DNA 生物合成的半保留复制（semi conservative replication）方式使子代细胞得到和亲代相一致的遗传物质，复制是具有高保真性（high fidelity）的。生物基因组庞大，无论线性的真核生物染色体或原核生物环状的 DNA，都采用双向复制（bidirectional replication）形式。DNA 解链方向和子链延长的方向性差异，决定子链合成过程为半不连续复制（semi discontinuous replication）。

一、半保留复制是 DNA 复制的基本特征

DNA 生物合成时，母链 DNA 解开为两股单链，各自作为模板（template）按碱基配对规律，合成与模板互补的子链。子代细胞的 DNA，一股单链从亲代完整地接受过来，另一股单链则完全重新合成，两个子细胞的 DNA 都和亲代 DNA 碱基序列一致，这种复



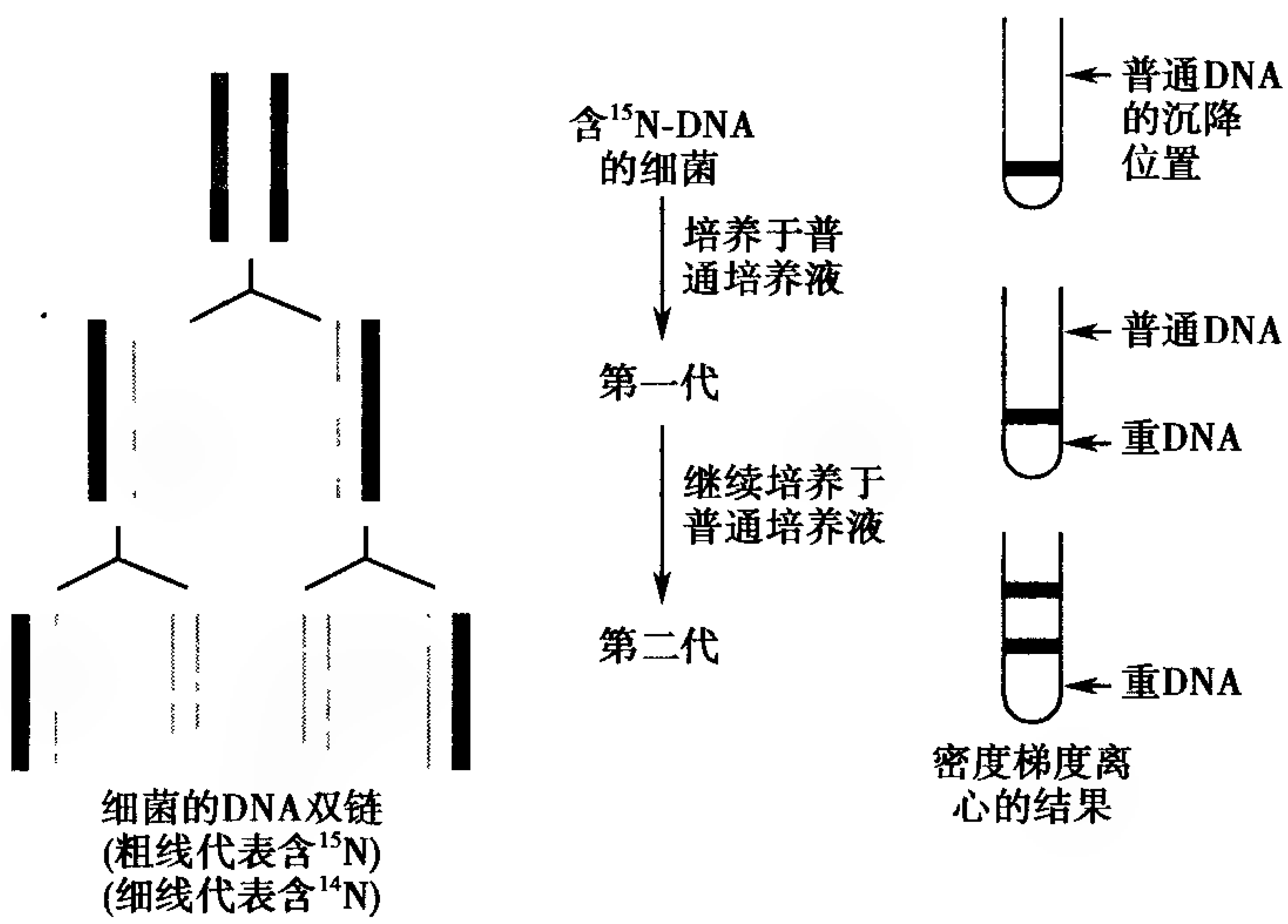
● 图 10-1　半保留复制保证子代和亲代 DNA 碱基序列的一致性

（a）母链 DNA；（b）复制过程打开的复制叉；（c）两个子代细胞的双链 DNA，实线链来自母链，虚线链是新合成的

制方式称为半保留复制（图 10-1）。

按图 10-1 那样的理论设想，在 DNA 双螺旋模型确立后即已提出。1958 年，M. Messelson 和 F. W. Stahl 用实验证实半保留复制。细菌可利用 NH_4Cl 作氮源合成 DNA。把细菌放在含 $^{15}NH_4Cl$ 的培养液中培养若干代，分离出的是含 ^{15}N 的“重”DNA，因其密度较高，用密度梯度离心法（density gradient centrifugation），^{15}N-DNA 形成的致密带位于普通 ^{14}N-DNA 形成的致密带下方。

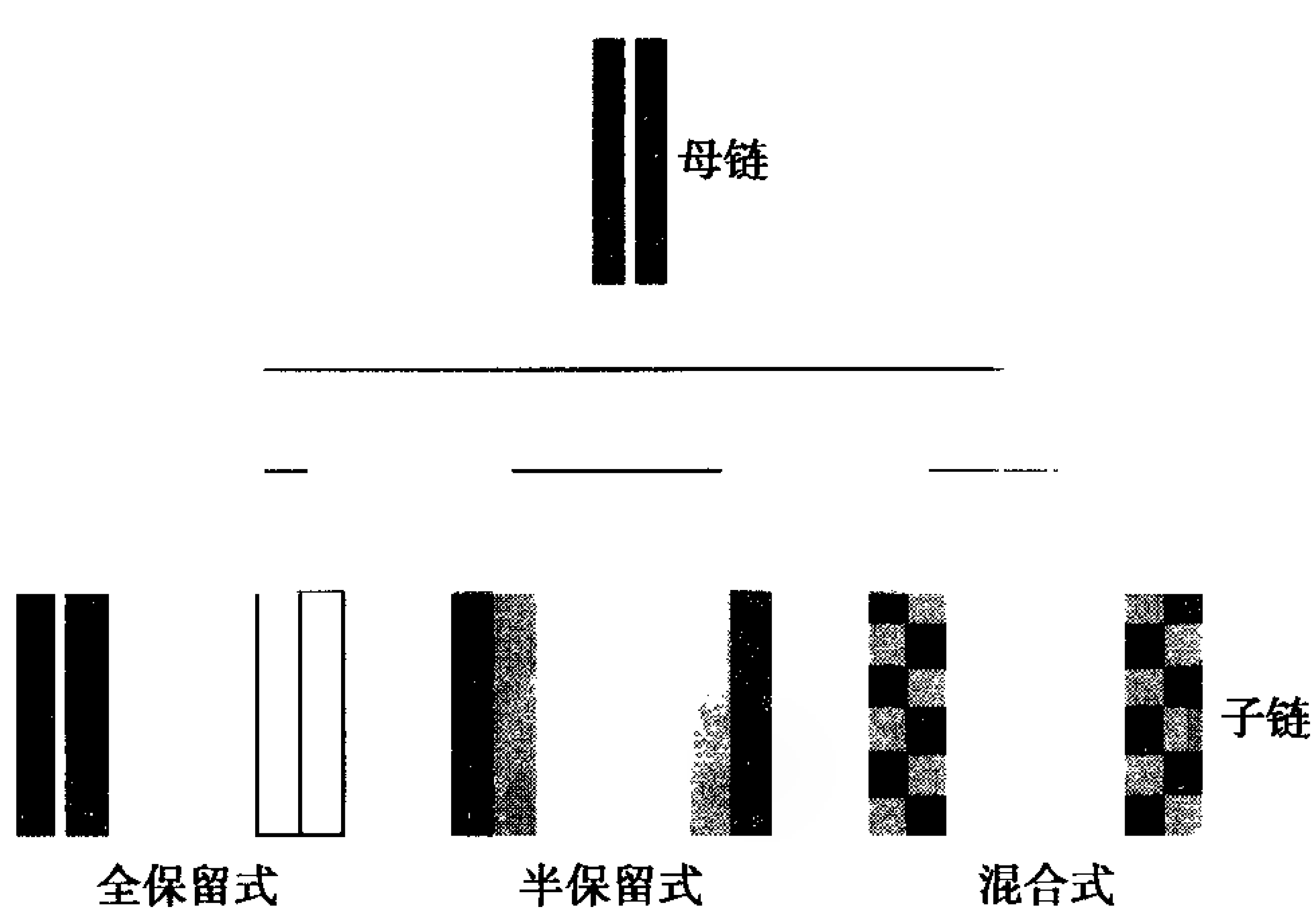
把含 ^{15}N-DNA 的细菌放回含普通的 NH_4Cl 培养液中培养。细菌在营养条件充足时，20 分钟就可以生长成新一代。提取子一代的 DNA 再作密度梯度离心分析，发现其致密带介于重带与普通带之间。看不到有单独的重带或普通 DNA 带（图 10-2）。



●图 10-2　DNA 半保留复制的证据

实验结果说明：子一代 DNA 双链中一股是 ^{15}N 单链，而另一股是 ^{14}N 单链，前者是从亲代接受和保留下来的，后者则是完全新合成的。亲代双链复制出子代双链的 DNA，有三种可能情况，即全保留式、半保留式或混合式的复制（图 10-3）。M. Messelson 和 F. W. Stahl 的实验，支持半保留复制的设想。其他两种的复制形式，都被实验的结果否定了。

^{15}N-DNA 的细菌在普通培养液中继续培育了二代，其 DNA 则是中等密度 DNA 与



●图 10-3　子链继承母链的遗传信息有三种可能的方式

普通 DNA 各占一半（图 10-2），这也进一步证明复制是采取半保留式的。实验还可按子 3 代、子 4 代……进行下去，^{15}N-DNA 则按 1/8、1/16……的几何级数逐渐被“稀释”掉。

半保留复制的阐明，对了解 DNA 的功能和物种的延续性有重大意义。DNA 双链两股单链有碱基互补的关系，双链中的一股可以确定其对应股的碱基序列。按半保留复制的方式，子代保留了亲代 DNA 的全部遗传信息，体现在代与代之间 DNA 碱基序列的一致性上（图 10-1）。

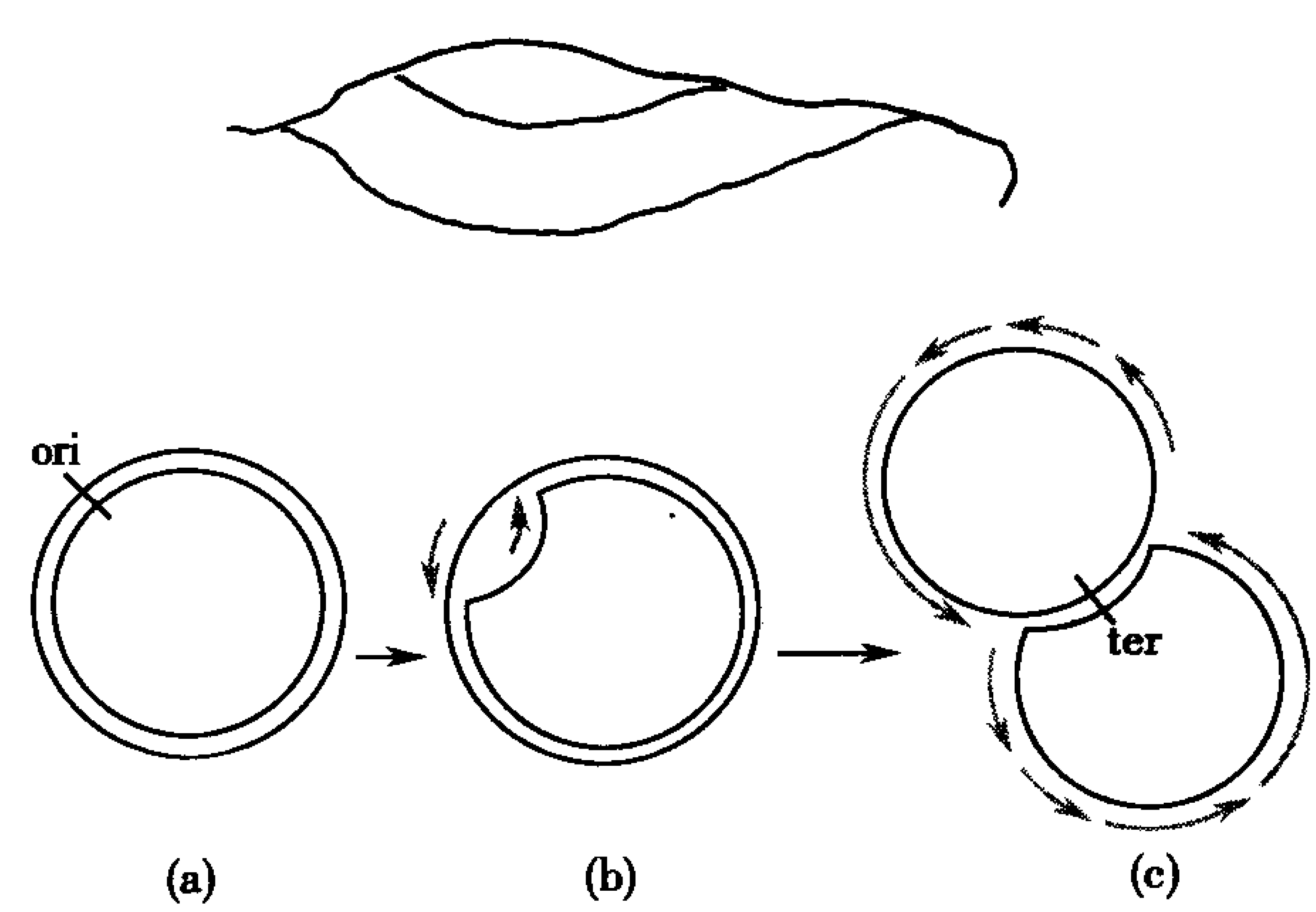
DNA 的遗传信息通过转录和翻译，即基因表达，决定细胞的蛋白质结构和功能，包括酶、代谢类型、免疫特性等。也就是说 DNA 通过复制和基因表达这两种主要功能，决定了生物的特性和类型。例如某种生物的后代只能是它的同种生物而不可能是其他，这就体现了遗传过程的相对保守性。此外，还有相应的酶学机制，使复制过程具有高保真性，这将在第二节论述。

遗传的保守性是相对而不是绝对的。自然界还存在着普遍的变异现象。遗传信息相对稳定，是物种稳定性的分子基础，但并不意味着同一物种个体与个体之间没有区别。例如病毒是简单的生物，流感病毒就有很多不同的毒株，不同毒株的感染方式、毒性差别可能很大。流行性感冒看来是常见、简单的疾病，在预防上也有相当大的难度。又如，地球上曾有过的人口和现有的几十亿人，除了单卵双胞胎之外，两个人之间不可能有完全一样的 DNA 分子组成（基因型）。在强调遗传恒定性的同时，不应忽视其变异性。

二、DNA 复制从起始点向两个方向延伸形成双向复制

细胞的增殖有赖于基因组复制而使子代得到完整的遗传信息。基因组（genome）是某一生物个体拥有的全部遗传物质，从分子意义上说，是指全部的 DNA 序列。原核生物基因组是环状 DNA，只有一个复制起点（origin）。复制时，DNA 从起始点向两个方向解链，形成两个延伸方向相反的复制叉，称为双向复制。例如大肠杆菌（*E. coli*）经放射性标记其 DNA 后，在电镜下观察到复制开始时呈眼睛状的图形（图 10-4）。

图 10-4 中可以看到最早生成两个方向相反的引物和两个延伸方向相反的复制叉。复制叉指的是 DNA 双链解开分成两股，各自作为模板，子链沿模板延长所形成的 Y 字形结

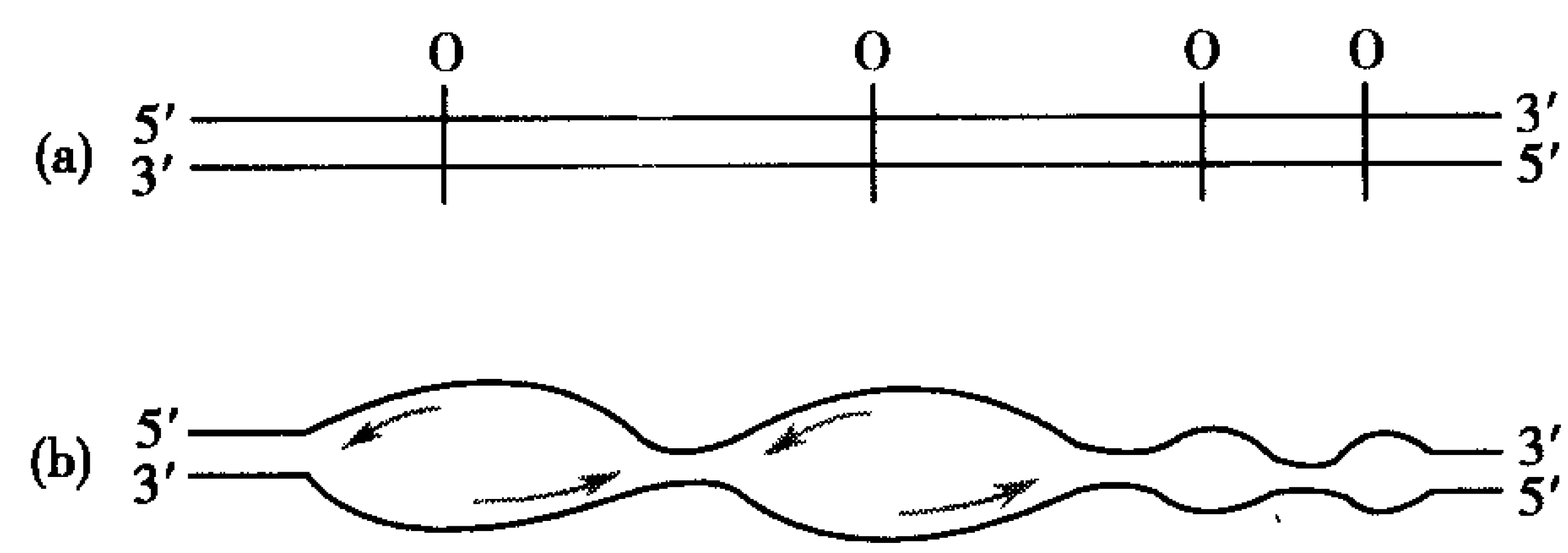


●图 10-4　原核生物 DNA 双向复制

上图：复制中的放射自显影图像；下图：解释复制过程的示意图
（a）环状双链 DNA 及其起始点 ori；（b）复制起始，解开成两个复制叉，各在领头链生成引物；（c）复制接近终止点 ter

构。图 10-1 的中部就是一个具体的复制叉。

真核生物基因组庞大而复杂，由多个染色体组成，全部染色体均需复制，每个染色体又有多个起始点，是多复制子的复制。复制子（replicon）是独立完成复制的功能单位，每个起始点产生两个移动方向相反的复制叉，复制完成时，复制叉相遇并汇合连接。从一个 DNA 复制起始点起始的 DNA 复制区域称为复制子（图 10-5）。



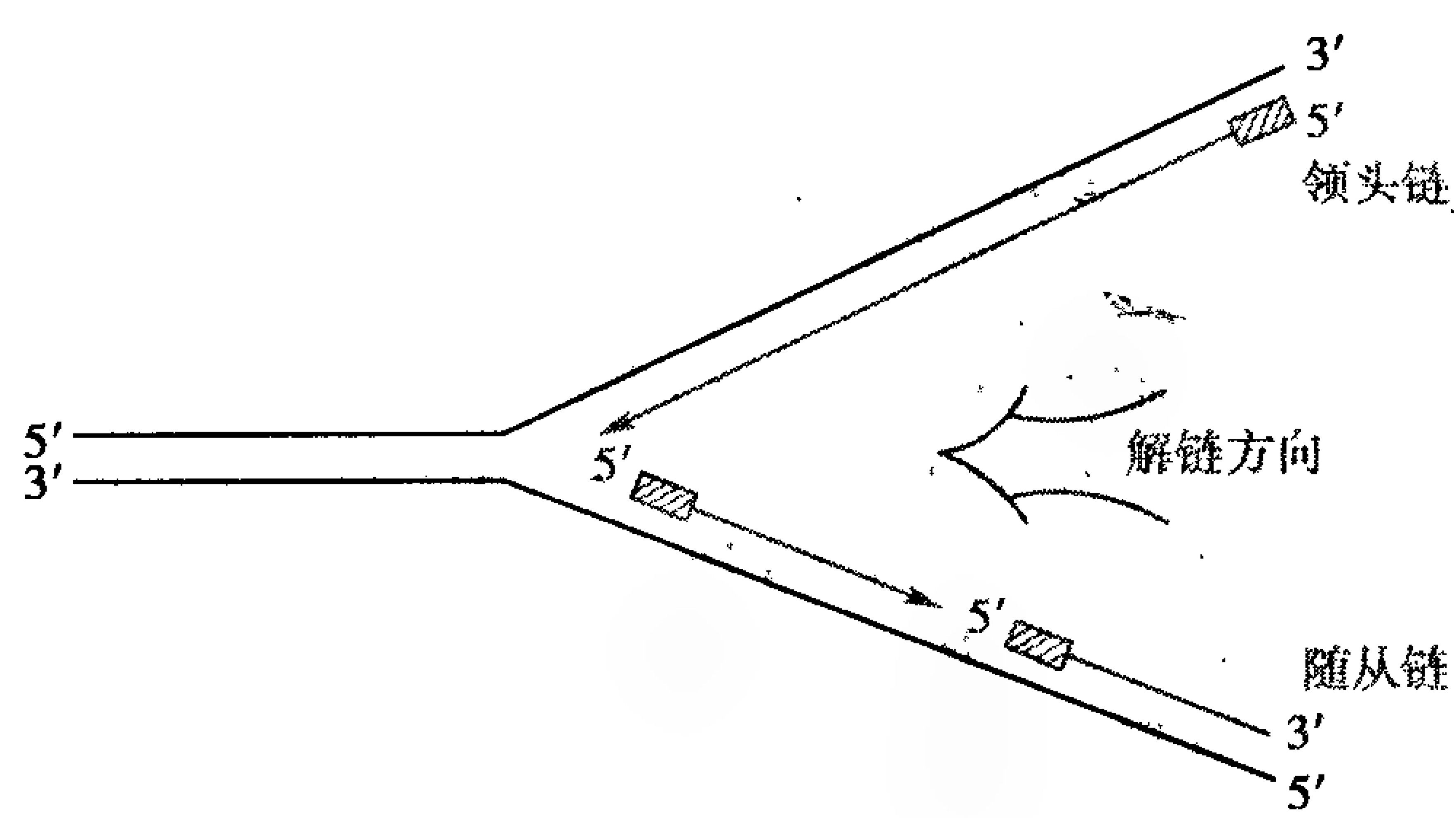
●图 10-5 真核生物的多复制子复制

（a）母链：O代表复制起始点；（b）复制子大小和起始的先后不同

高等生物有数以万计的复制子，复制子长度差别很大，约在 13 千碱基对～900 千碱基对（kb，kilobase pair）之间。原核生物是单复制子完成的复制，称为复制体（replisome）。

三、DNA 一股子链复制的方向与解链方向相反导致半不连续复制

DNA 双螺旋的两股单链走向相反，一链为 5′至 3′方向，其互补链是 3′至 5′方向。复制解链形成复制叉上的两股母链也是走向相反，子链沿着母链模板复制，只能从 5′至 3′方向延伸。在同一复制叉上只有一个解链方向（图 10-6）。



●图 10-6 用复制方向与解链方向不一致以理解不连续复制的成因

顺着解链方向生成的子链，复制是连续进行的，这股链称为领头链（leading strand）。另一股链因为复制的方向与解链方向相反，不能顺着解链方向连续延长，必须待模板链解开至足够长度，然后从 5′→3′生成引物并复制子链。延长过程中，又要等待下一段有足够长度的模板，再次生成引物而延长。这股不连续复制的链称为随从链（lagging strand）。领头链连续复制而随从链不连续复制，就是复制的半不连续性。从图 10-4 和图 10-5 都可以看到，在引物生成和子链延长上，领头链都是先走一步的。

1968 年，在美国的日本科学家冈崎用电子显微镜及放射自显影技术观察到这种不连续复制现象。后人证实不连续复制片段只出现于同一复制叉上一股链。复制完成后，不连续片段经过去除引物，填补引物留下的空隙，连成完整的 DNA 链。复制中的不连续片段

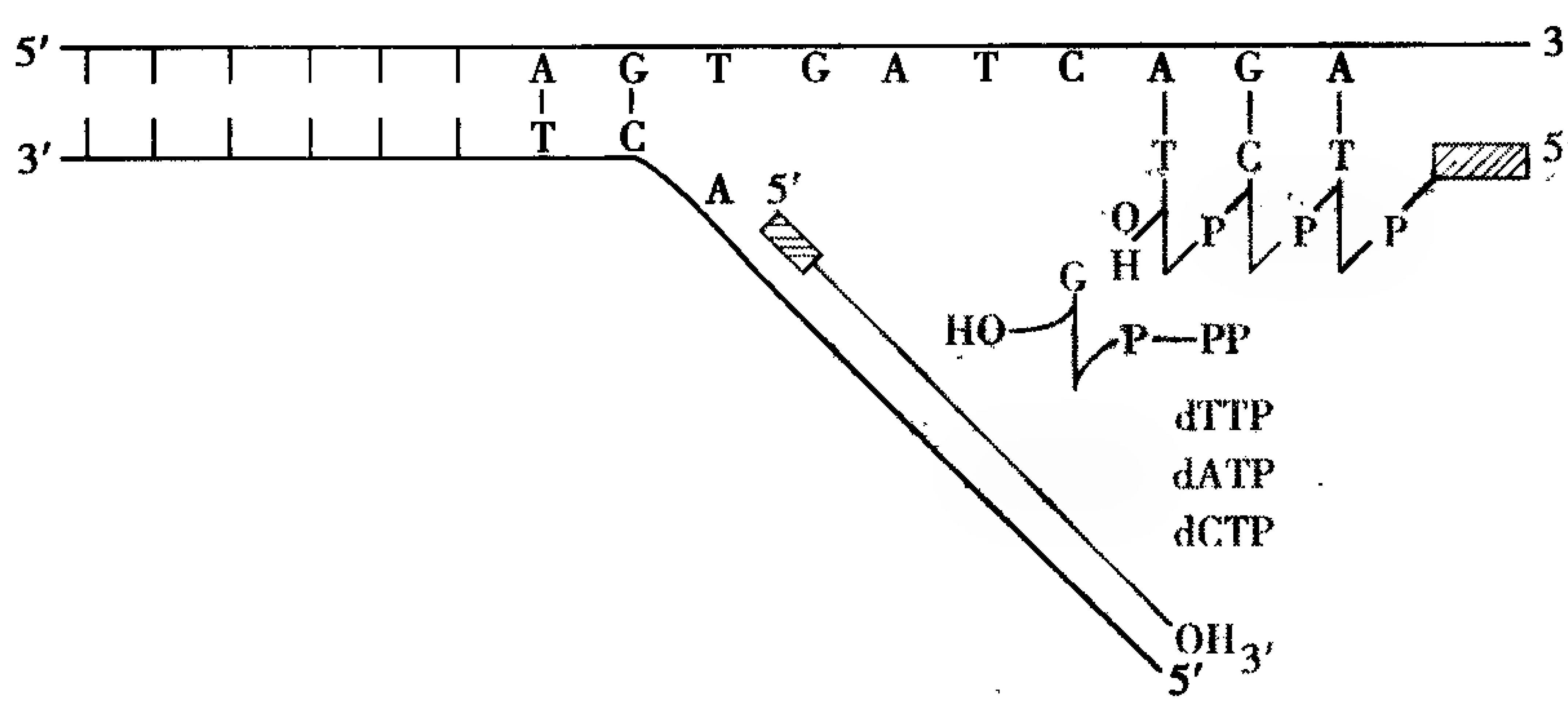
就命名为冈崎片段（Okazaki fragment）。

第二节 DNA 复制的酶学和拓扑学变化

复制是在酶催化下的核苷酸聚合过程，需要多种生物分子共同参与：
底物即 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP，总称 dNTP（deoxynucleotide triphosphate）；
聚合酶依赖 DNA 的 DNA 聚合酶，简称 DNA-pol；
模板指解开成单链的 DNA 母链；
引物提供 3′-OH 末端使 dNTP 可以依次聚合；
其他酶和蛋白质因子。

一、核苷酸和核苷酸之间生成磷酸二酯键是复制的基本化学反应

核苷酸和核苷酸之间生成 3′，5′ 磷酸二酯键而逐一聚合，是复制的基本化学反应（图 10-7）。



●图 10-7 复制过程的脱氧核苷酸聚合
带斜线的小方框代表引物

反应的底物是脱氧三磷酸核苷（dNTP），而参入子链的是脱氧单磷酸核苷（dNMP，deoxynucleotide monophosphate）。N 代表 4 种碱基的任一种。图 10-7 的反应可简示为：

$(dNMP)n + dNTP \rightarrow (dNMP)n+1 + PPi$ 或 $(dATP)m + (dGTP)n + (dCTP)y + (dTTP)z \rightarrow (dATMP + dGMP + dCMP + dTMP)m+n+y+z + (m+n+y+z)PPi$

图 10-7 还反映出：DNA 链生成需引物和模板，遵照碱基互补规律，按模板指引合成子链以及子链延长的方向性。新链的延长只可沿 5′向 3′方向进行，因为底物的 5′-P 是加合到延长中的子链（或引物）3′端核糖的 3′-OH 基上生成磷酸二酯键的。dNTP 底物 3 个磷酸根，最靠近核糖的称为 α-P，向外依次为 β-P 和 γ-P。α-P 与子链末端核糖的 3′-OH 连接。

二、DNA 聚合酶催化核苷酸之间聚合

DNA 聚合酶全称是依赖 DNA 的 DNA 聚合酶（DNA-dependent DNA polymerase），简称 DNA-pol，是 1958 年由 A. Kornberg 在 *E. coli* 中首先发现的，当时从 100kg 细菌沉渣中提取仅 0.5g 纯酶。试管内实验还证实，加有模板、底物和引物，该酶可催化新链 DNA 生成。双螺旋模型确立后，又直接证明了 DNA 是可以复制的，这是个重大的发现。

当时把此酶定名为复制酶（replicase）。发现其他种类的DNA pol后，最先发现的酶就称为DNA-pol Ⅰ。

（一）原核生物的DNA聚合酶分为三型

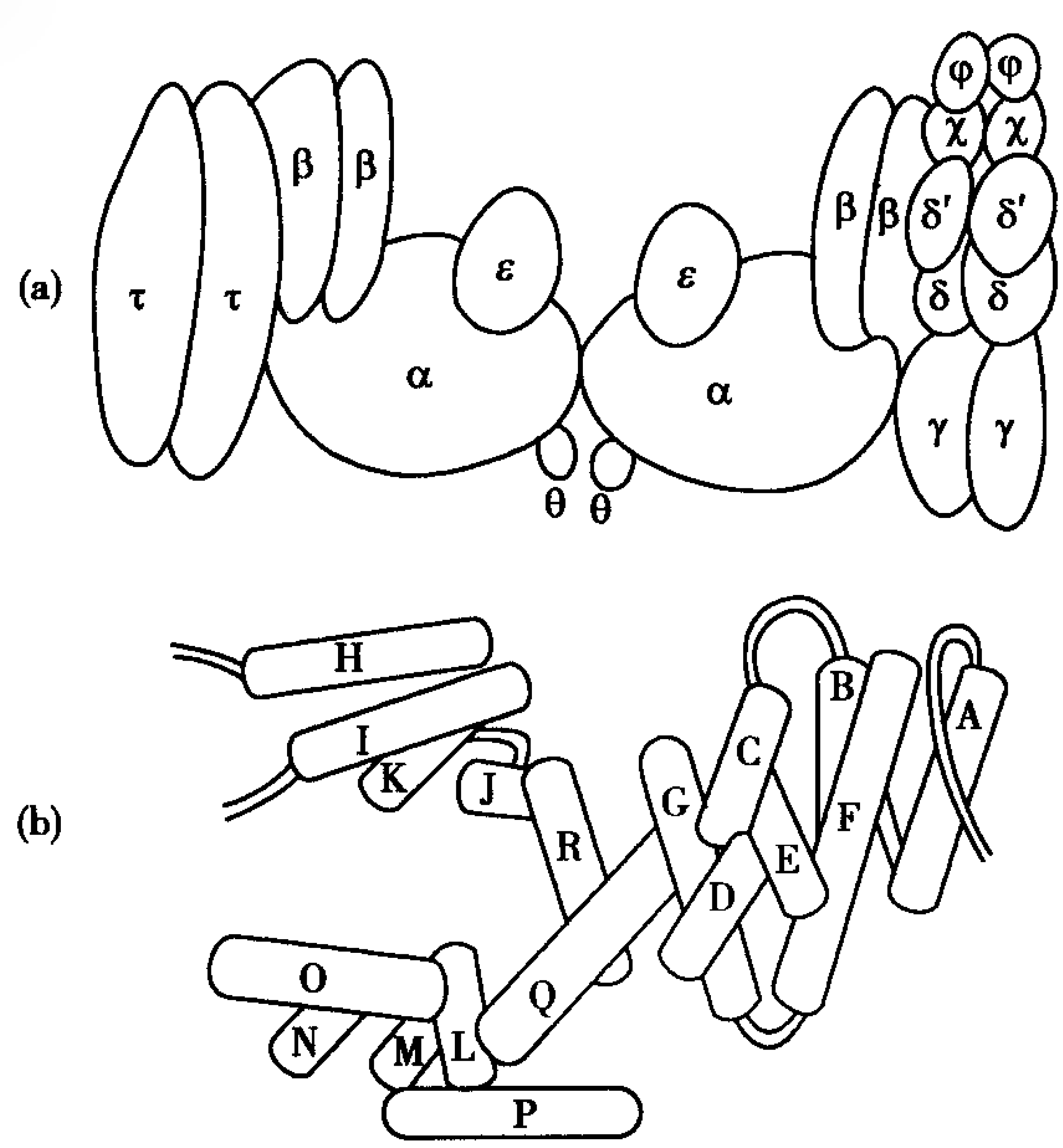
大肠杆菌经人工处理和筛选，可培育出基因有变异的菌株。DNA-pol Ⅰ基因缺陷的菌株，经实验证明照样可进行DNA复制。从变异菌株中相继提取到DNA-pol Ⅱ和DNA-pol Ⅲ。这三种聚合酶都有5′→3′延长脱氧核苷酸链的聚合活性及3′→5′核酸外切酶活性。三种酶的不同点见表10-1。

表10-1 原核生物的DNA-pol

	DNA-pol Ⅰ	DNA-pol Ⅱ	DNA-pol Ⅲ
分子量（kD）	109	120	250
组成	单肽链	?	多亚基不对称二聚体
分子数/细胞	400	?	20
5′→3′核酸外切酶活性	有	无	无
基因突变后的致死性	可能	不可能	可能

DNA-pol Ⅲ的比活性远高于pol Ⅰ，每分钟可催化多至10^5次聚合反应，据此认为，DNA-pol Ⅲ是原核生物复制延长中真正起催化作用的酶。DNA-pol Ⅲ由10种亚基组成不对称异源二聚体（图10-8a）。α、ε、θ组成核心酶，兼有5′→3′聚合活性和3′→5′外切酶活性。ε亚基是复制保真性所必需的。两边的β亚基起夹稳模板链并使酶沿模板滑动的作用。其余的亚基统称γ-复合物，有促进全酶组装至模板上及增强核心酶活性的作用。

DNA-pol Ⅰ的二级结构以α螺旋为主（图10-8b），可划分为从A至R共18个α-螺旋肽段。螺旋肽段之间由非螺旋结构连接。其中H区与I区之间的无规结构较长，有50个氨基酸残基，在图中未表示出来。I螺旋与O螺旋之间有较大的空隙，可以容纳DNA链，



●图10-8 DNA-pol的分子结构

（a）*E. coli* DNA聚合酶Ⅲ是不对称二聚体；（b）DNA聚合酶Ⅰ由18个α-螺旋区组成，H、I之间是较大的非螺旋区连接，图中未显示出

而50个氨基酸的无规结构，就像一个盖子那样与I、O螺旋区共同把DNA链包围起来，使其向一个方向滑动。DNA-pol Ⅰ只能催化延长约20个核苷酸左右，说明它不是复制延长过程中起作用的酶。DNA-pol Ⅰ在活细胞内的功能，主要是对复制中的错误进行校读，对复制和修复中出现的空隙进行填补。

用特异的蛋白酶，可以把DNA-pol Ⅰ水解为两个片段，在F，G螺旋之间发生断裂。从A至F螺旋区共323个氨基酸残基，称为小片段，此片段有5′→3′核酸外切酶活性。从G螺旋区直至R螺旋区及C末端，共604个氨基酸残基，称为大片段，或称Klenow片段（Klenow fragment），具有DNA聚合酶活性和3′→5′核酸外切酶活性。Klenow片段是实验室合成DNA和进行分子生物学研究中常用的工具酶。

DNA-pol Ⅱ基因发生突变，细菌依然能存活，推想它是在pol Ⅰ和pol Ⅲ缺失情况下暂时起作用的酶。DNA-pol Ⅱ对模板的特异性不高，即使在已发生损伤的DNA模板上，它也能催化核苷酸聚合。因此认为，它参与DNA损伤的应急状态修复（SOS修复，见本章第五节）。

科学之家

A. Kornberg由于在1955年发现了DNA聚合酶，他与他以前的导师S. Ochoa，发现RNA聚合酶，共享1959年的诺贝尔生理医学奖。1967年，他合成了第一个具有生物功能的病毒——Φ×174。在获奖10年之后，人们才知道，他所发现的DNA聚合酶并非细菌真正用于复制DNA的酶，在细胞内执行这个任务的是另一种新发现的酶——DNA聚合酶Ⅲ。A. Kornberg发现的酶是DNA聚合酶Ⅰ，在DNA复制中起校读和填补空隙的作用。非常有趣的是，DNA聚合酶Ⅲ是他的二儿子T. B. Kornberg在哥伦比亚大学读书时发现的，T. B. Kornberg现在是加州大学旧金山分校的生物化学教授。Kornberg家族是“科学之家”，A. Kornberg的长子——斯坦福大学的R. D. Kornberg由于在真核生物转录酶结构研究中成绩的卓越获得了2006年的诺贝尔化学奖。A. Kornberg的妻子也是他的实验助手，他们共发现了30多种酶，对酶的研究情有独钟，十八年前他写了一本自传式的引人入胜的普及生物化学特别是酶知识的作品，书名就叫《酶的情人》。

（二）常见的真核细胞DNA聚合酶有五种

在真核细胞至少发现有15种DNA聚合酶。1991年，Ito等根据氨基酸序列以及同大肠杆菌DNA聚合酶的同源性，将真核生物DNA聚合酶（pol）分成4大家族——A、B、X、Y家族。5种常见的真核生物的DNA聚合酶列于表10-2，各种DNA-pol都有5′→3′核酸外切酶活性。

表10-2　真核生物的DNA聚合酶

DNA-pol	α	β	γ	δ	ε
分子量（kD）	16.5	4.0	14.0	12.5	25.5
5′→3′聚合活性	中	?	高	高	高
3′→5′核酸外切酶活性	−	−	+	+	+
功能	起始引发，引物酶活性	低保真度的复制	线粒体DNA复制	延长子链的主要酶，解螺旋酶活性	填补引物空隙，切除修复，重组

DNA-pol α催化新链延长的长度有限，但它能催化RNA链的合成，因此认为它具引物酶活性。复制延长中主要起催化作用的是DNA-pol δ，相当于原核生物的DNA-pol Ⅲ；

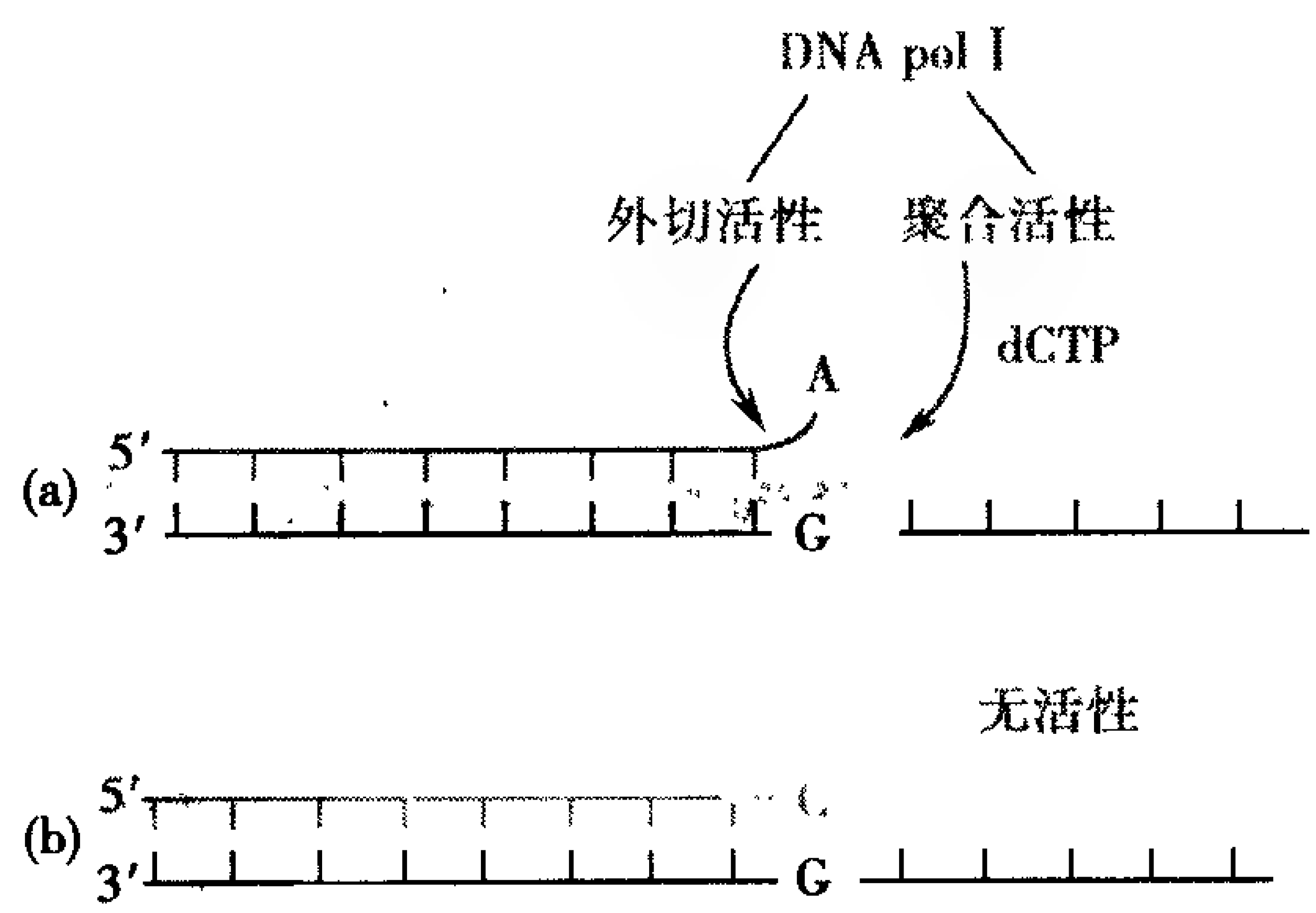
此外它还有解螺旋酶的活性。至于高等生物中是否还有独立的解螺旋酶和引物酶，目前还未能确定。但是，在病毒感染培养细胞（Hela/SV40）的复制体系中，发现SV40病毒的T抗原有解螺旋酶活性。DNA-pol β复制的保真度低，可能是参与应急修复复制的酶。DNA-pol ε与原核生物的DNA-pol Ⅰ相类似，在复制中起校读、修复和填补引物缺口的作用。DNA-pol γ是线粒体DNA复制的酶，见本章第四节。

三、核酸外切酶的校读活性和碱基选择功能是复制保真性的酶学依据

复制按照碱基配对规律进行，是遗传信息能准确传代的基本原理。此外还需酶学的机制来保证复制的保真性。

(一) 核酸外切酶活性在复制中辨认切除错配碱基并加以校正

核酸外切酶（exonuclease）是指能从核酸链的末端把核苷酸依次水解出来的酶，可见外切酶是有方向性的。从3′端切除核苷酸的称为3′→5′核酸外切酶。原核生物的DNA-pol Ⅰ和真核生物的DNA-pol δ的3′→5′外切酶活性都很强。现以DNA-pol Ⅰ为例，说明其外切酶和聚合酶活性两方面的功能，如何能在复制中辨认切除错配碱基并加以校正（图10-9），此过程又称错配修复（mismatch repair）。



●图10-9 DNA pol Ⅰ的校读功能
(a) DNA pol Ⅰ的外切酶活性切除错配碱基，并用其聚合活性参入正确配对的底物；(b) 碱基配对正确，DNA-pol Ⅰ并不表现外切酶活性

图10-9中，模板链是G，新链错配成A而不是C。DNA-pol Ⅰ的3′→5′外切酶活性就把错配的A水解下来，同时利用5′→3′聚合酶活性补回正确配对的C，复制可以继续下去，这种功能称为即时校读（proofread）。实验也证明：如果是正确的配对，3′→5′外切活性是不表现的。DNA-pol Ⅰ还有5′→3′外切酶活性，实施切除引物、切除突变片段的功能。

(二) 复制的保真性依赖正确的碱基选择

DNA聚合酶对模板的依赖性，是子链与母链能准确配对，使遗传信息延续和传代的保证。碱基配对的关键又在于氢键的形成。G—C以3个氢键，A—T以2个氢键维持配对，错配碱基之间难以形成氢键。据此推想：复制中核苷酸之间生成磷酸二酯键，应在氢键准确搭配之后发生。DNA聚合酶靠其大分子结构协调非共价（氢键）与共价（磷酸二酯键）键的有序形成。

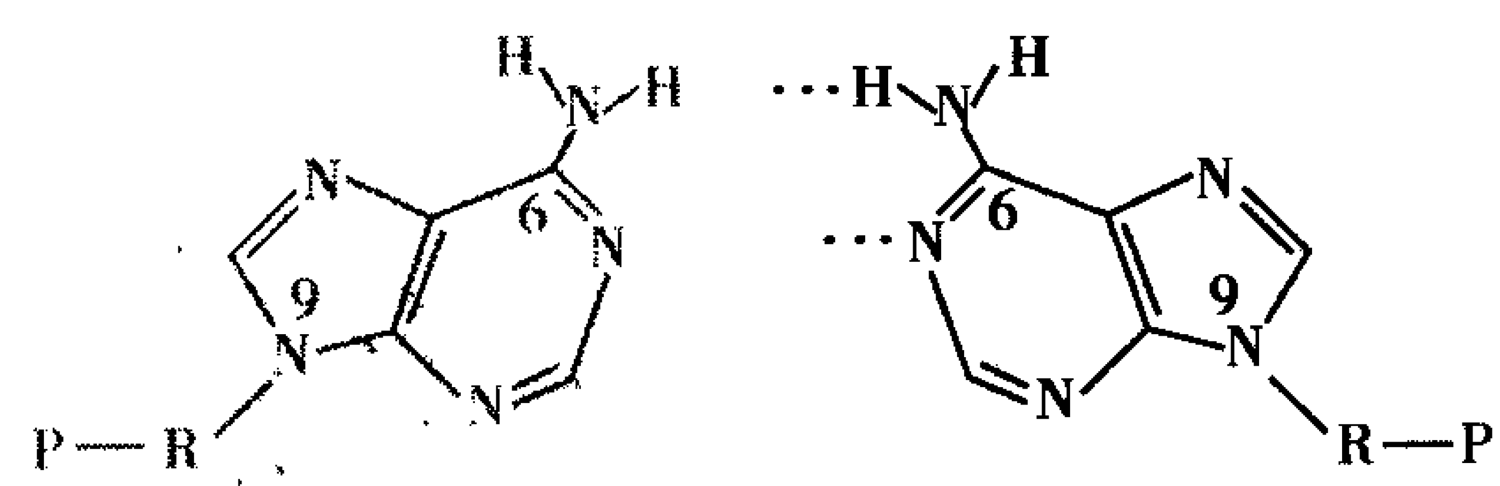
原核生物DNA聚合酶Ⅲ是复制延长中主要起催化作用的酶。对DNA-pol Ⅲ的深入研究，发现这种酶对核苷酸的参入（incorporation）有选择功能。例如母链上是T，DNA-

pol Ⅲ选择 A，而不选 T，C，G 进入子链相应位置。这是用“错配”实验可证实的。用同一种脱氧核苷酸的寡聚体作模板，例如用 21 聚腺苷酸 poly（dA)$_{21}$作模板，用 poly (dT)$_{20}$作复制引物，可以观察引物 3′-OH 连上的是否是胸苷酸（T）。即使 4 种核苷酸都加入到含 DNA-pol Ⅲ的反应体系中，第 21 位也只会出现 T。但若只向反应体系加单一种的 dNTP 作底物，就“迫使”引物在第 21 位延长中出现错配。用柱层析技术可以把 DNA-pol Ⅲ各个亚基组分分离，然后又再重新组合。如果重新组合的 DNA-pol Ⅲ不含 ε 亚基，复制错配频率出现较高，说明 ε 亚基是执行碱基选择功能的。错配实验用不含 ε 亚基的 DNA-pol Ⅲ作催化，实验结果发现，错配出现的频率有如下规律：

$$dG/dA > dA/dA > dC/dA$$

用聚 dA 为模板，dG、dA 或 dC 作为唯一的脱氧核苷酸来源。可以看到：模板为嘌呤时，错配为嘌呤（dG，dA）比错配为嘧啶（dC）的机会要大。

嘌呤的化学结构能形成顺式和反式构型（图 10-10），与相应的嘧啶形成氢键配对，嘌呤应处于反式构型。而要形成嘌呤—嘌呤配对，则其中一个嘌呤必须旋转 180°，形成反式构型。错配频率的实验说明，DNA-pol Ⅲ对嘌呤的构型表现不同亲和力，酶是通过对不同碱基构型亲和力的不同来实现其选择作用的。



●图 10-10 嘌呤核苷酸的顺式（左）和反式（右）构型
反式构型利于嘌呤-嘧啶之间氢键（虚线）的形成

前已述及，DNA pol Ⅲ的 10 个亚基中，以 α、ε 和 θ 作为核心酶并组成较大的不对称二聚体。核心酶中，α 亚基有 5′→3′聚合活性，ε 有 3′→5′核酸外切酶活性以及碱基选择功能。θ 亚基未发现有催化活性，可能起维系二聚体的作用（图 10-8）。对各亚基功能的深入研究认为：在核苷酸聚合之前或在聚合当时，酶就可以控制碱基的正确选择。

连同上述的校读功能，DNA 复制的保真性至少要依赖三种机制：①遵守严格的碱基配对规律；②聚合酶在复制延长中对碱基的选择功能；③复制出错时有即时的校读功能。

四、复制中的解链伴有 DNA 分子拓扑学变化

当 J. Watson 和 F. Crick 发表 DNA 双螺旋结构时，就预言生物细胞要解开 DNA 双链是个关键难题。DNA 分子的碱基埋在双螺旋内部，只有把 DNA 解成单链，它才能起模板作用。

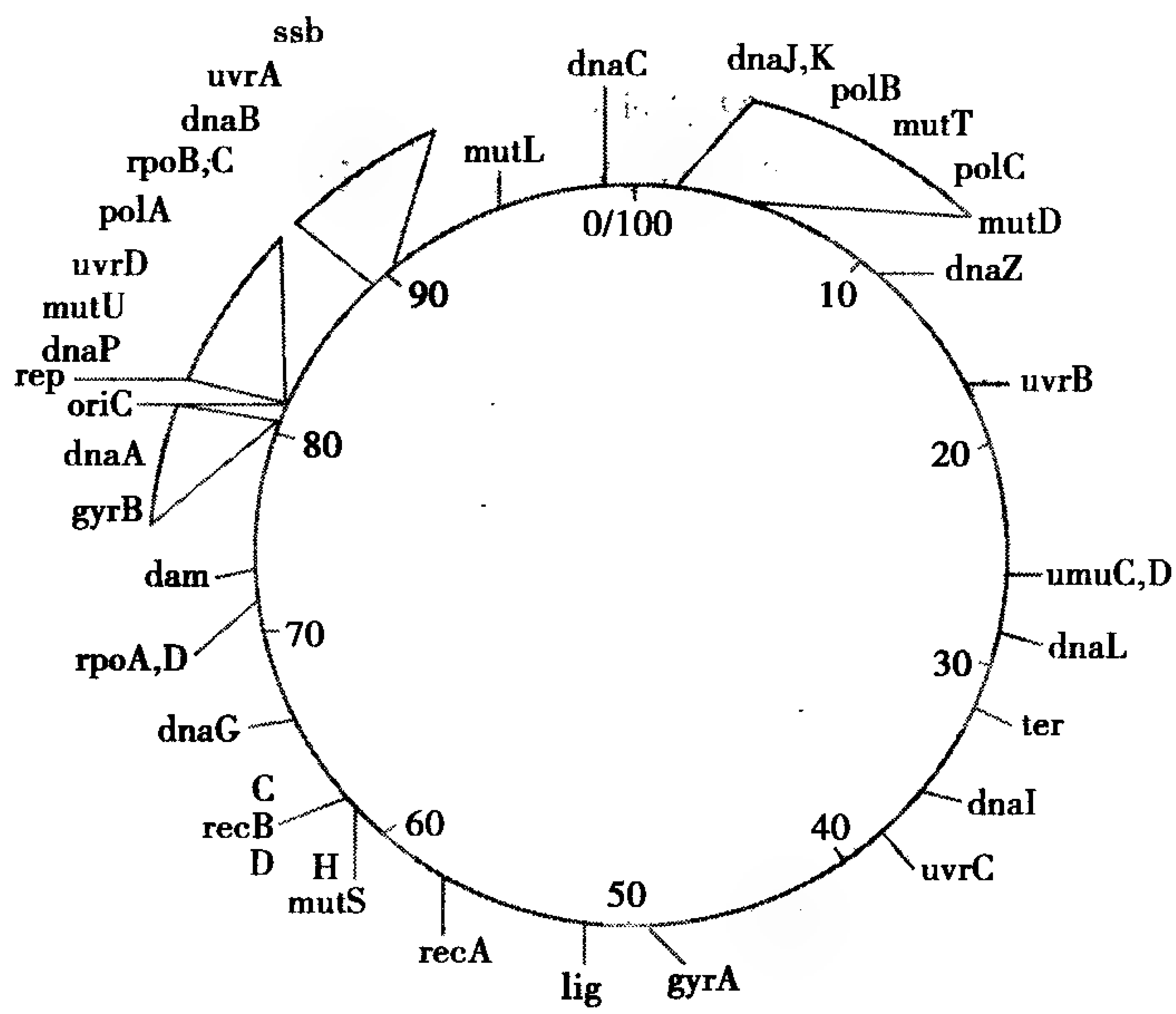
(一) 多种酶参与 DNA 解链和稳定单链状态

复制起始时，需多种酶和辅助的蛋白质因子，共同解开、理顺 DNA 链，并维持 DNA 分子在一段时间内处于单链状态（表 10-3）。

大肠杆菌结构相对简单，繁殖速度快，是较早用于分子遗传学研究的生物模型。对大肠杆菌的变异株分析，可以查找出各种基因。习惯上把 *E. coli* 的环状 DNA 分为 100 等分编制其基因图。早期发现的与复制相关的基因定名为 dnaA，dnaB……dnaX 等。以后检出这些基因相应的蛋白质，则以首字母大写 D 命名为 DnaA，DnaB……DnaX 等（图 10-11）。

表 10-3　原核生物复制起始的相关蛋白质

蛋白质（基因）	通用名	功　能
DnaA（dnaA）		辨认起始点
DnaB（dnaB）	解螺旋酶	解开 DNA 双链
DnaC（dnaC）		运送和协同 DnaB
DnaG（dnaG）	引物酶	催化 RNA 引物生成
SSB	单链 DNA 结合蛋白	稳定已解开的单链
拓扑异构酶（gyr A，B）		理顺 DNA 链



●图 10-11　*E. coli* 基因图，与复制有关的基因
注意起始点 oriC 与终止点 ter 的位置

在此之前对 *E. coli* 复制的研究已发现一种复制蛋白 rep（replication），它的作用是利用 ATP 供能来解开 DNA 双链。以后的研究发现 rep 蛋白就是 DnaB，并且定名为解螺旋酶（helicase）。*E. coli* DNA 复制起始的解链是由 DnaA，B，C 共同起作用而发生的。

引物酶（primase）是复制起始时催化生成 RNA 引物的酶。它不同于催化转录的 RNA 聚合酶（RNA-pol）。*E. coli* 的 RNA pol 由 rpoBC，rpoA 基因编码各亚基，利福平（rifampicin）是 RNA-pol 的特异性抑制剂。引物酶由 dnaG 基因编码，对利福平不敏感。母链 DNA 解成单链，不能立即按模板相应位置将 dNTP 逐一延长为子链，因为 DNA-pol 没有催化游离 dNTP 之间相互聚合的能力。RNA 聚合酶和引物酶都可以催化游离 NTP（不是 dNTP）聚合。由引物酶催化生成的引物（primer）是 DNA 生物合成所需的短链 RNA，它可以提供 3′-OH 末端，在 DNA-pol 催化下逐一加入 dNTP 而延长 DNA 子链。

单链 DNA 结合蛋白（single stranded DNA binding protein，SSB）：作为模板的 DNA 处于单链状态，而 DNA 分子只要符合碱基配对，又总会有形成双链的倾向，以使分子达到稳定状态和免受胞内广泛存在的核酸酶降解。细胞内存在 SSB，此蛋白质曾被称为螺旋反稳定蛋白（helix destabilizing protein，HDP），在 *E. coli* 中，它由 177 个氨基酸残基组成同源四聚体，结合单链 DNA 的跨度约 32 个核苷酸。SSB 作用时表现协同效应，保证 SSB 在下游区段的继续结合。可见，它不像聚合酶那样沿着复制方向向前移动，而是不断

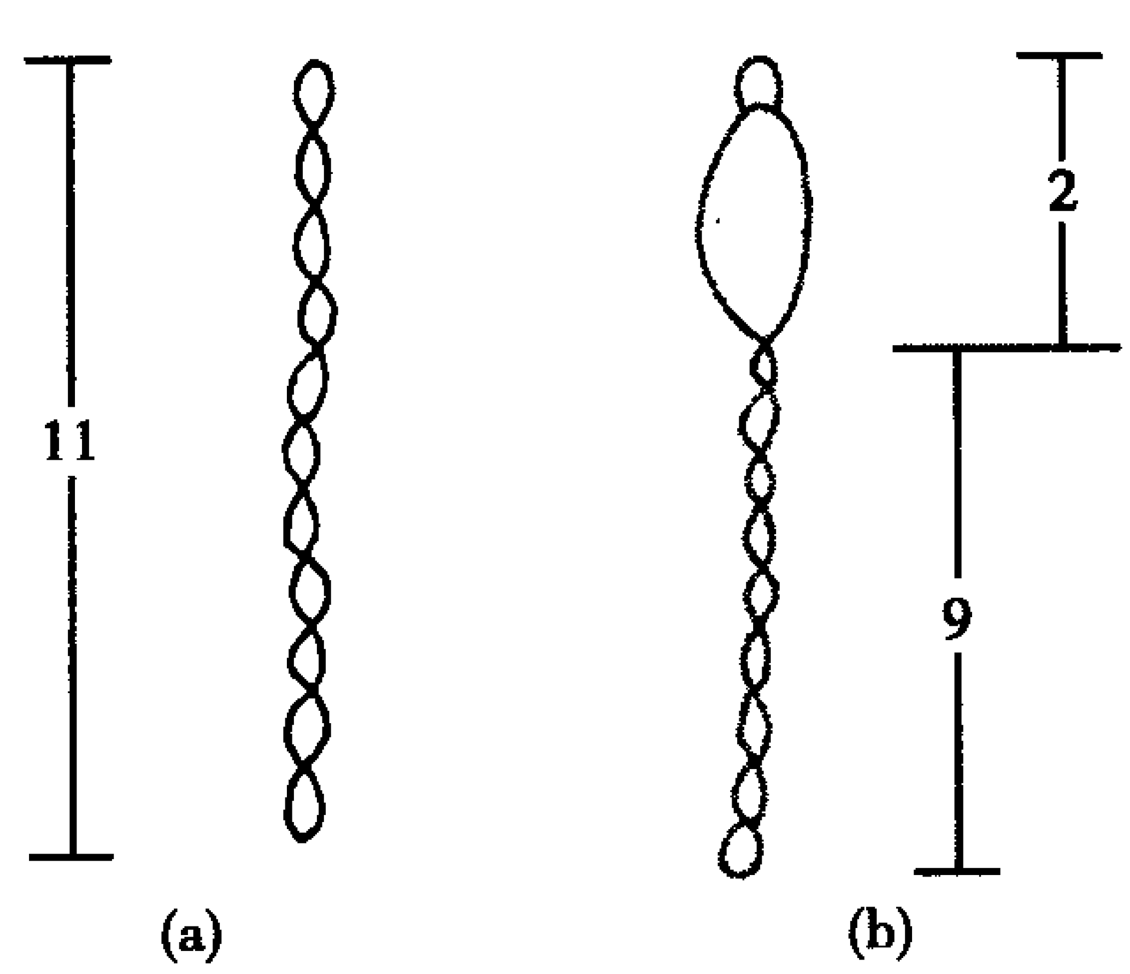
地结合、脱离的。SSB的作用是在复制中维持模板处于单链状态并保护单链的完整。

（二）DNA拓扑异构酶改变DNA超螺旋状态、理顺DNA链

DNA拓扑异构酶（DNA topoisomerase），简称拓扑酶。拓扑酶广泛存在于原核及真核生物，分为Ⅰ型和Ⅱ型两种，最近还发现了拓扑酶Ⅲ。拓扑异构酶Ⅰ在原核生物中曾称为ω-蛋白。真核生物的拓扑异构酶Ⅰ曾用过多种名称：转轴酶（swivelase）、解缠酶（untwisting enzyme）、切口-封闭酶（nicking closing enzyme）和松弛酶（relaxing enzyme）等。这是不同实验室从不同的角度研究其功能时对这种酶的功能进行概括性描述而命名的。从这里也可以体会它的功能的各个方面。原核生物拓扑异构酶Ⅱ又叫旋转酶（gyrase），真核生物的拓扑酶Ⅱ又分好几种亚型。

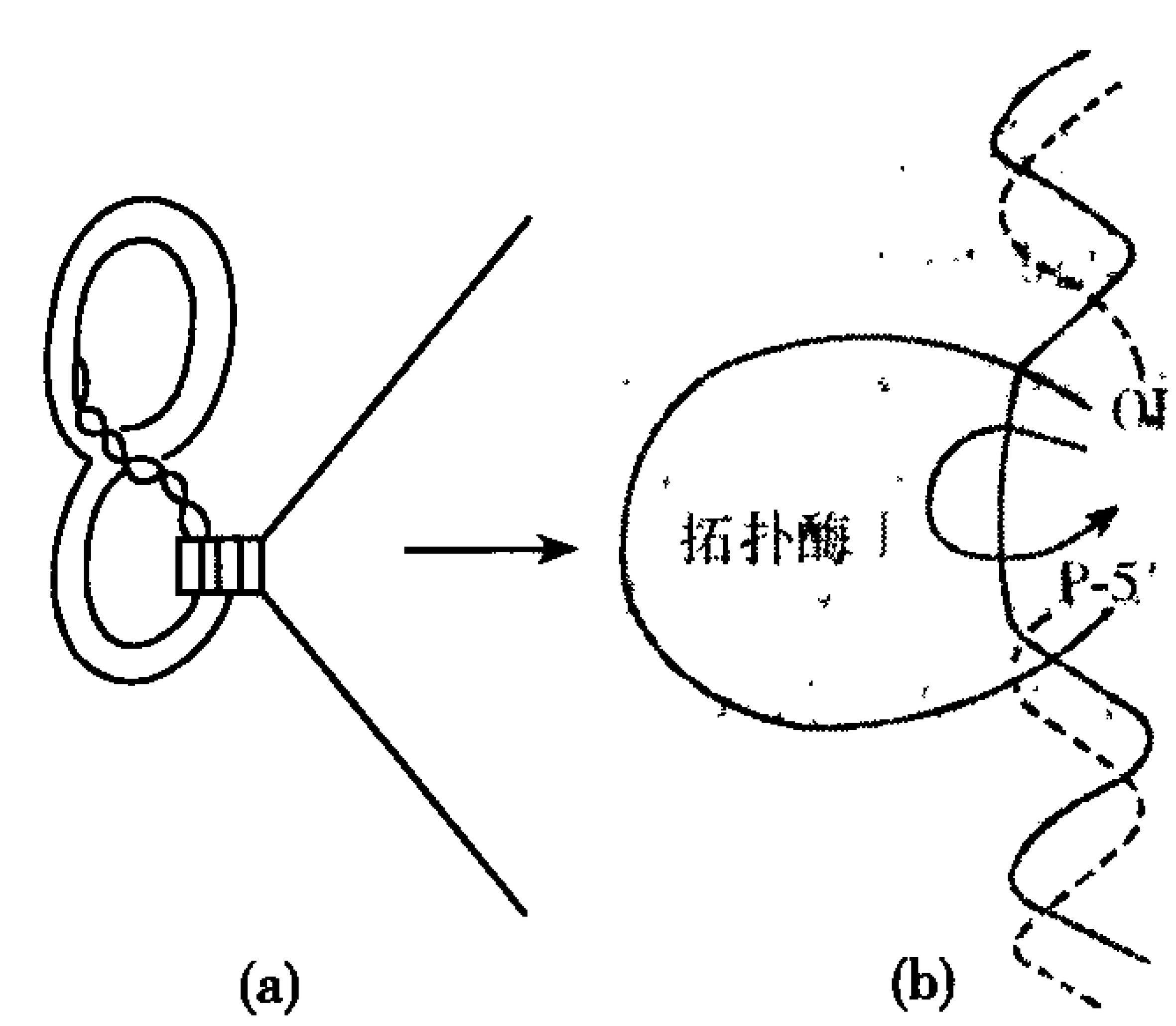
拓扑一词，是指物体或图像作弹性移位而保持物体原有的性质。DNA双螺旋沿轴旋绕，复制解链也沿同一轴反向旋转，复制速度快，旋转达100次/秒，造成DNA分子打结、缠绕、连环现象。闭环状态的DNA又按一定方向扭转形成超螺旋（图10-12）。用一橡皮圈沿相同方向拧转，可体会该图描述的情况。通常DNA分子的拧转是适度的。盘绕过分，称为正超螺旋，盘绕不足为负超螺旋。复制时，部分DNA要呈松弛状态。试图在已拧转的橡皮圈中打开中间一段就会体会其余部分的过度拧紧变为正超螺旋。复制中的DNA分子也会遇到这种正、负超螺旋及局部松弛等过渡状态。上述这些，均需拓扑酶作用以改变DNA分子的拓扑构象，理顺DNA链来配合复制进程。

拓扑酶对DNA分子的作用是既能水解，又能连接磷酸二酯键（图10-13）。拓扑酶Ⅰ切断DNA双链中一股，使DNA解链旋转中不致打结，适当时候又把切口封闭，使DNA变为松弛状态。拓扑酶Ⅰ的催化反应不需ATP。拓扑酶Ⅱ在无ATP时，切断处于正超螺旋状态的DNA分子双链某一部位，断端通过切口使超螺旋松弛；在利用ATP供能情况下，松弛状态的DNA又进入负超螺旋状态，断端在同一酶催化下连接恢复。这些作用均使复制中的DNA能解结、连环或解连环，达到适度盘绕。母链DNA与新合成链也会互相缠绕，形成打结或连环，也需拓扑异构酶Ⅱ的作用。DNA分子一边解链，一边复制，可见，拓扑酶在复制全过程中都是有作用的。



●图10-12 复制过程正超螺旋的形成

（a）代表超螺旋解开前；（b）代表超螺旋局部解开后，其下方9个螺旋被压缩



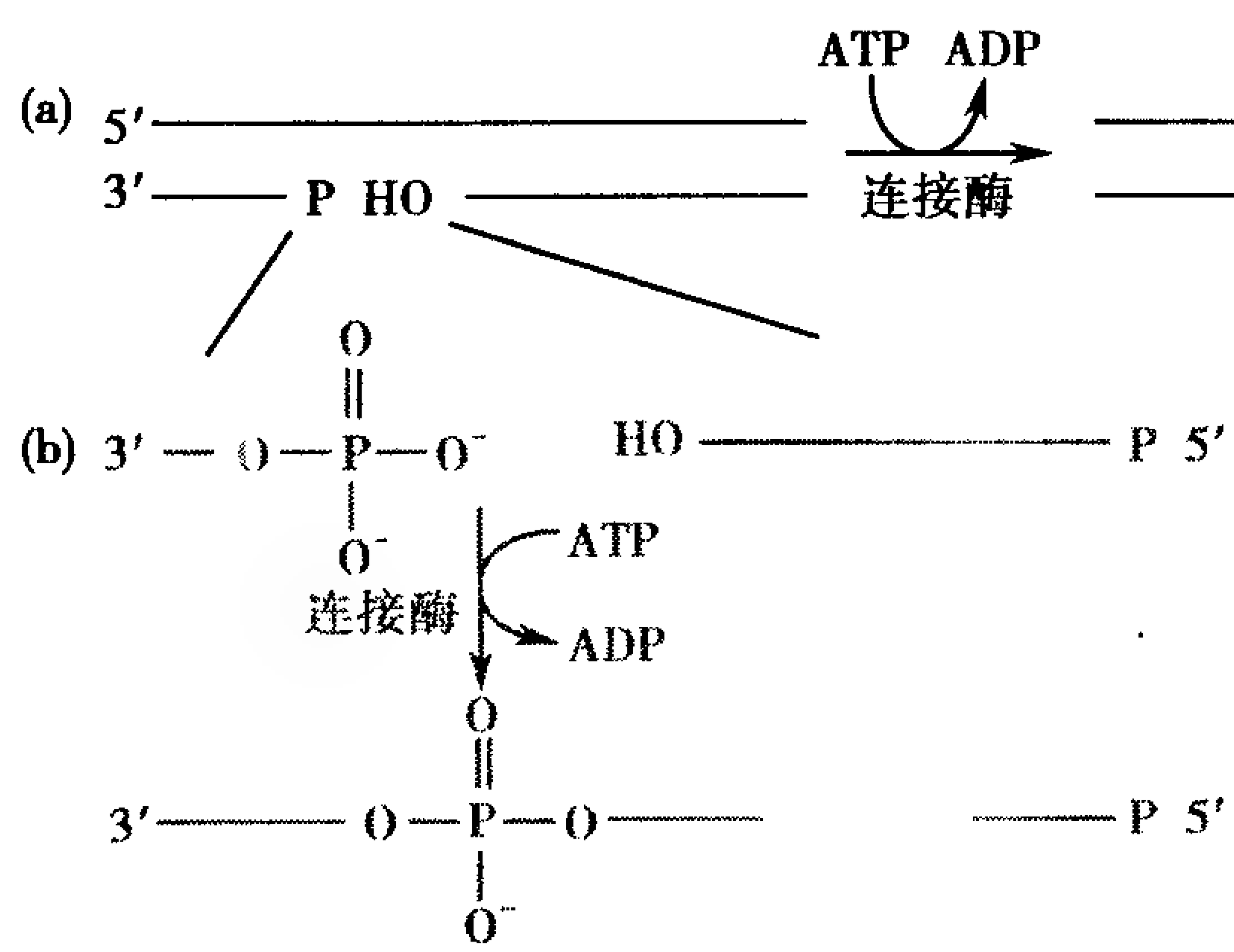
●图10-13 拓扑酶的作用方式

（b）是把（a）局部放大经拓扑酶Ⅰ作用，两个环变为一个环

五、DNA连接酶连接DNA双链中的单链缺口

DNA连接酶（DNA ligase）连接DNA链3′-OH末端和另一DNA链的5′-P末端，使两者生成磷酸二酯键，从而把两段相邻的DNA链连成完整的链。连接酶的催化作用需要

消耗 ATP。实验证明：连接酶连接碱基互补基础上的双链中的单链缺口，它并没有连接单独存在的 DNA 单链或 RNA 单链的作用。复制中子链分段合成，是不连续的，最后总留有缺口，要靠连接酶接合。图 10-14 显示连接酶的催化作用。图的上部说明其作用于互补双链上一股不连续 DNA 链；图的下部显示 DNA 连接酶的催化作用。



●图 10-14　DNA 连接酶的作用

（a）连接酶连接双链 DNA 上其中一单链的缺口；（b）被连接的缺口放大，示连接酶催化的反应

DNA 连接酶不但在复制中起最后接合缺口的作用，在 DNA 修复、重组、剪接中也起缝合缺口作用。如果 DNA 两股都有单链缺口，只要缺口前后的碱基互补，连接酶也可连接。因此它也是基因工程（第十四章）的重要工具酶之一。

比较 DNA 聚合酶、拓扑酶和连接酶，三者都催化 3′，5′-磷酸二酯键的生成，但又各有不同（表 10-4）。

表 10-4　三种酶催化生成磷酸二酯键的比较

[illegible]	提供核糖 3′-OH	提供 5′-P	结果
DNA 聚合酶	引物或延长中的新链	游离 dNTP 去 PPi	(dNTP) n+1
连接酶	复制中不连续的两条单链		不连续→连续链
拓扑酶	切断、整理后的两链		改变拓扑状态

第三节　DNA 生物合成过程

复制是基因组全套 DNA 的合成，是在细胞分裂之前进行的，原核生物基因组相对简单，传代也快，便于研究。目前有关复制的知识来自 *E. coli* 的实验居多。真核生物基因组庞大、复杂，其单个复制子的复制过程，大致与原核生物相似。真核生物复制的起始和终止，与原核生物有较大差别。随着有关基因组复制知识的不断积累，人们对复制过程与人类健康和疾病的关系有了更深的了解。人类基因组计划于 2001 年完成 DNA 测序工作，为基因组作为一个整体的复制研究提供了更有利的条件。

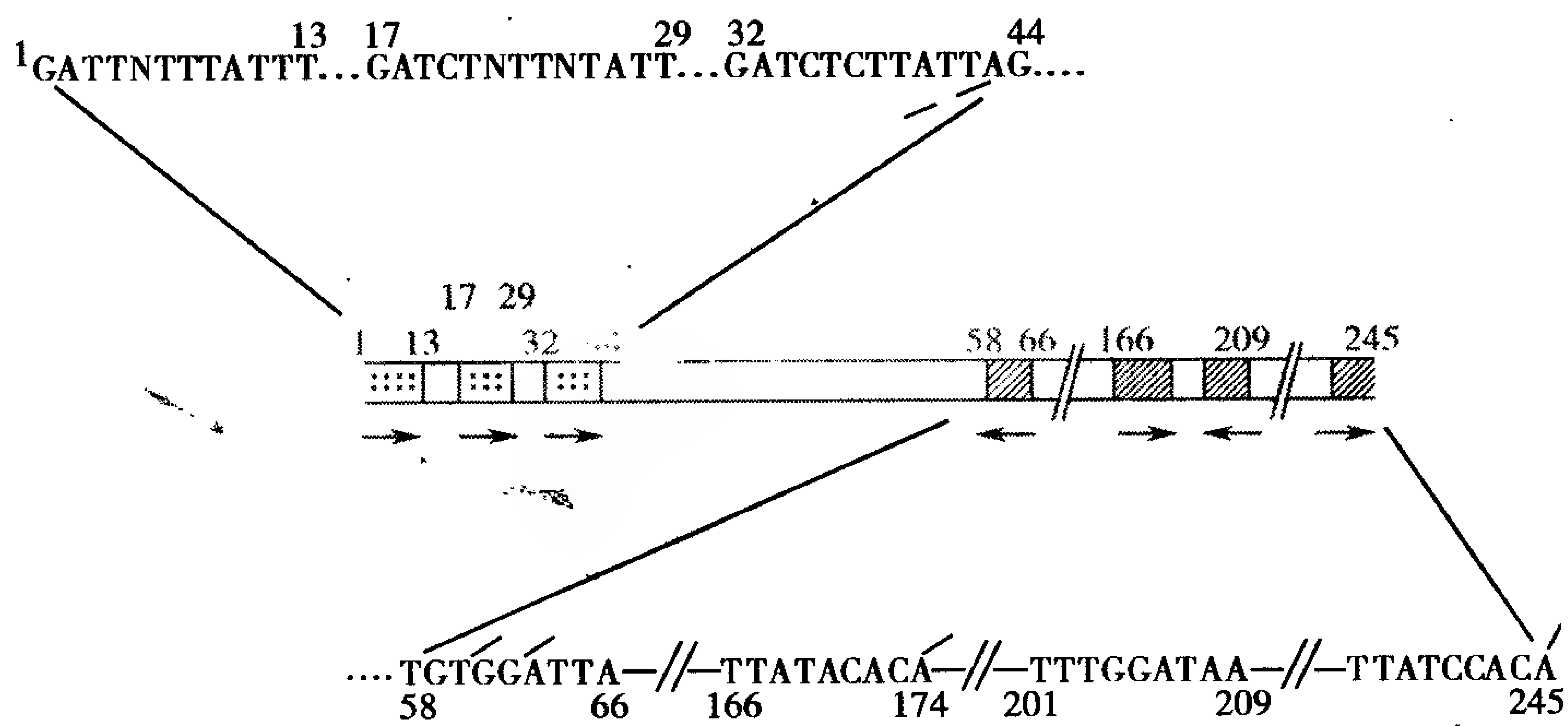
一、原核生物的 DNA 生物合成

（一）复制起始：DNA 解链形成引发体

起始是复制中较复杂的环节，简单来说就是 DNA 解成复制叉，形成引发体及合成

引物。

1. DNA 解链 复制不是在基因组上的任何部位都可以开始的。*E. coli* 上有一个固定的复制起始点，在第 82 等分位点上（图 10-11），称为 oriC。oriC 跨度为 245bp，碱基序列分析发现这段 DNA 上有 3 组串联重复序列和 2 对反向重复序列（图 10-15）。上游的串联重复序列称为识别区；下游的反向重复序列碱基组成以 A、T 为主，称为富含 AT（AT rich）区。DNA 双链中，AT 配对多的部位容易解链，因为 AT 配对只有 2 个氢键维系，而 GC 配对有 3 个氢键。



● 图 10-15 *E. coli* 复制起始点 oriC

上方示三组串联重复序列 下方示两组反向重复序列

解链过程主要由 DnaA、B、C 三种蛋白质共同参与。DnaA 蛋白是由相同亚基组成的四聚体。复制起始时，DnaA 蛋白辨认并结合于串联重复序列（AT 区）上。然后，几个 DnaA 蛋白互相靠近，形成类似核小体（第二章）的 DNA 蛋白质复合体结构，这一结构可促使 AT 区的 DNA 进行解链。DnaB 蛋白（解螺旋酶）在 DnaC 蛋白的协同下，结合和沿解链的方向移动，使双链解开足够用于复制的长度，并且逐步置换出 DnaA 蛋白（图 10-16）。此时，复制叉已初步形成。

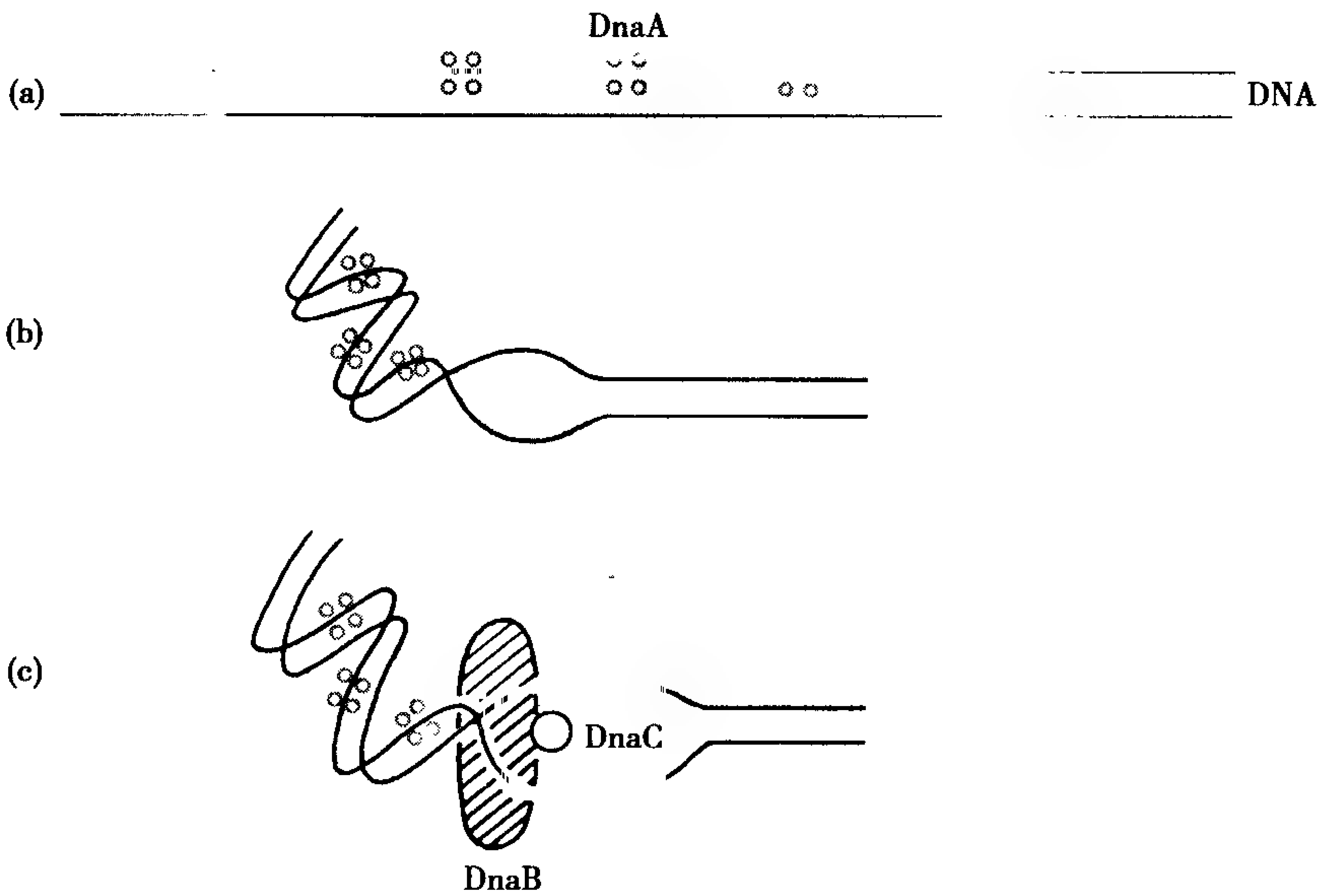
SSB（单链 DNA 结合蛋白）此时也参与进来。SSB 在一定时间内使复制叉保持适当的长度，利于核苷酸依据模板参入。

2. 引发体和引物 复制过程需要引物（primer），引物是由引物酶催化合成的短链 RNA 分子。在上述解链的基础上，已形成了 DnaB、DnaC 蛋白与起始点相结合的复合体，此时引物酶进入。形成含有解螺旋酶、DnaC 蛋白、引物酶（即 DnaG 蛋白）和 DNA 的起始复制区域的复合结构称为引发体。

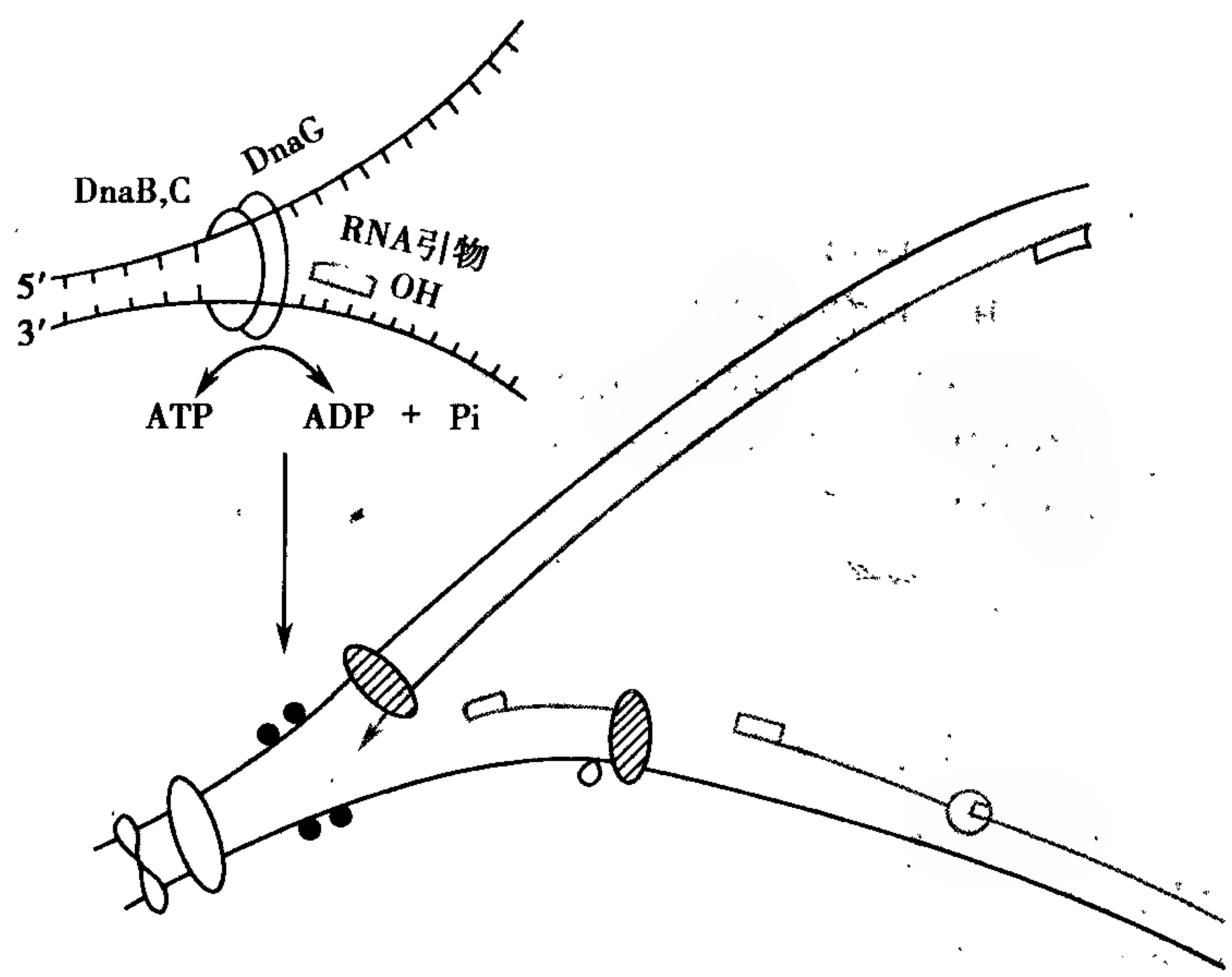
引发体的蛋白质组分在 DNA 链上移动，需由 ATP 供给能量。在适当位置上，引物酶依据模板的碱基序列，从 5′→3′方向催化 NTP（不是 dNTP）的聚合，生成短链的 RNA 引物（图 10-17）。

引物长度约为十几个至几十个核苷酸不等。引物合成的方向也是自 5′-端至 3′-端。已合成的引物必然留有 3′-OH 末端，此时就可进入 DNA 的复制延长。在 DNA-pol Ⅲ 催化下，引物末端与 dNTP 生成磷酸二酯键。新链每次反应后亦留有 3′-OH，复制就可进行下去。

解链是一种高速的反向旋转，其下游势必发生打结现象。此时由 DNA 拓扑异构酶，可能主要是Ⅱ型酶作用，在将要打结或已打结处作切口。下游的 DNA 穿越切口并作一定程度旋转，把结打开或解松，然后旋转复位连结。这样解链就不因打结的阻绊而继续下



●图 10-16　复制起始，DNA 双链的解开
(a) DnaA 蛋白四聚体结合于 oriC 的重复序列上；(b) DnaA 蛋白与 DNA 形成复合物，引起解链；(c) DnaB 在 DnaC 的辅助下结合于初步打开的双链，并用其解螺旋酶活性开链



●图 10-17　引发体的生成（上）和 DNA 解成的复制叉（下）
复制叉上各种酶、蛋白质用符号表示

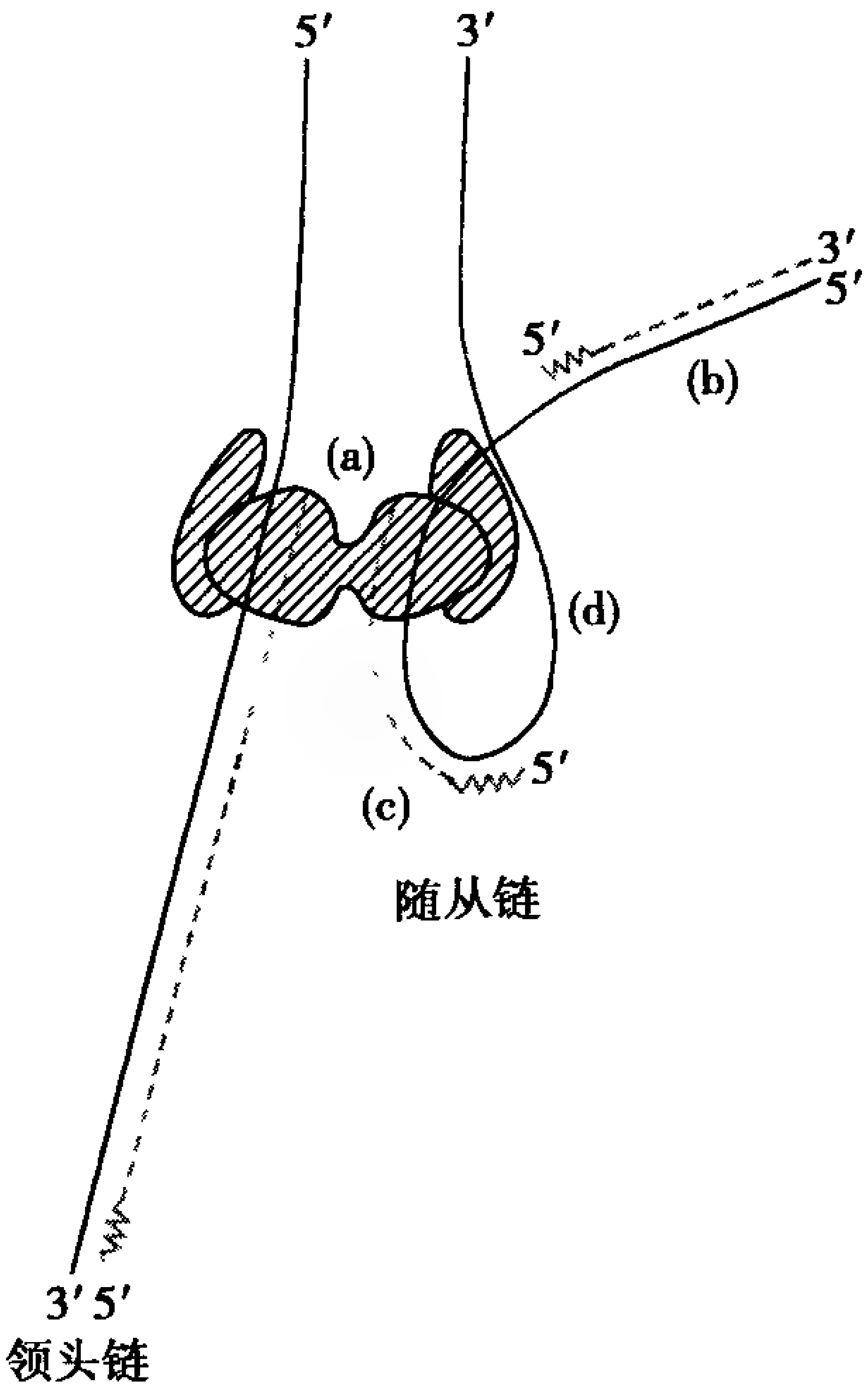
解螺旋酶　DNA 聚合酶Ⅲ　引物酶和引物　DNA 聚合酶Ⅰ

（校读）　●●单链 DNA 结合蛋白　连接酶　DNA 拓扑异构酶

去。即使不出现打结现象，双链的局部打开，也会导致 DNA 超螺旋的其他部分过度拧转（见图 10-12），形成正超螺旋。拓扑酶通过切断、旋转和再连结的作用，实现 DNA 超螺旋的转型，即把正超螺旋变为负超螺旋，实验证明：负超螺旋比正超螺旋有更好的模板作用。从道理上也是可以理解的：扭得不那么紧的超螺旋当然比过度扭紧的更容易解开成单链。

(二) 复制的延长过程：领头链连续复制，随从链不连续复制

复制的延长指在 DNA-pol 催化下，dNTP 以 dNMP 的方式逐个加入引物或延长中的子链上，其化学本质是磷酸二酯键的不断生成，每次的化学反应见图 10-7。在复制叉上子链和母链的碱基配对关系见图 10-1。原核生物催化延长反应的酶是 DNA-pol Ⅲ（图 10-8），它是多亚基的不对称二聚体蛋白质，有两个由 α、ε 和 θ 亚基组成的核心酶，分别催化领头链和随从链延长。底物 dNTP 的 α-磷酸与引物或延长中的子链上 3′-OH 反应后，dNMP 的 3′-OH 又成为链的末端，使下一个底物可以参入。复制从 5′→3′延长，指的是子链合成的方向。领头链的子链沿着 5′→3′方向可以连续地延长。



●图 10-18　同一复制叉上领头链和随从链由相同的 DNA-pol 催化延长

(a)DNA-pol Ⅲ的核心酶和 β 亚基；(b)、(c)、(d)分别是随从链的先复制，正在复制和未复制的片段，实线是母链，虚线代表子链

冈崎片段的形成原因，是因为随从链的子链延长方向与解链的方向相反，需要等待复制叉解开至相当长度，生成新的引物，然后又在引物 3′-OH 末端上延长。也就是说复制延长中，在随从链上要不断生成引物。延长过程中引物的生成只需引物酶，因为复制叉既已展开，就不必 DnaA、DnaB、DnaC 蛋白生成引发体。原核生物冈崎片段长度为 1000～2000 个核苷酸。

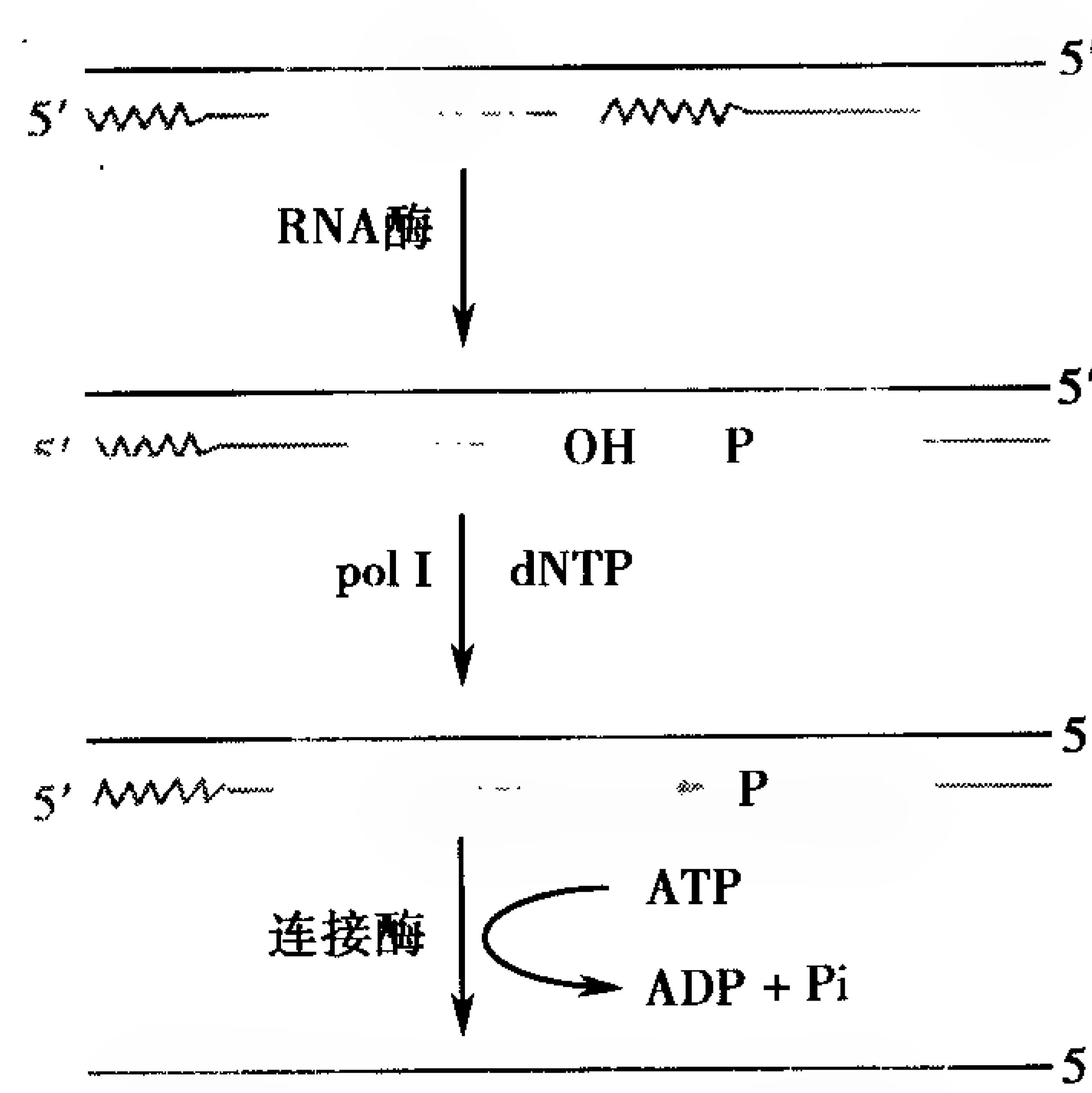
在同一个复制叉上，领头链的复制先于随从链，但两链是在同一 DNA-pol Ⅲ催化下进行延长的。这是因为随从链的模板 DNA 可以折叠或绕成环状，因而与前导链正在延长的区域对齐（图 10-18）。从图中可以体会到，由于随从链作 360°的绕转，领头链和随从链的生长点都处在 DNA-pol Ⅲ核心酶的催化位点上。解链方向就是酶的前进方向，亦即复制叉从已解开向待解开片段伸展的方向。复制叉上解开的模板单链走向相反，因而其中一股出现不连续复制的冈崎片段。

DNA 复制延长速度相当快。以 *E. coli* 为例，营养充足、生长条件适宜时，细菌 20 分钟即可繁殖一代。*E. coli* 基因组 DNA 全长约 3000kb，依此计算，每秒钟能参入的核苷酸达 2500 个：

$$\text{延长速度} = 3000\text{kb}/20\text{min} = 3000000\text{bp}/1200\text{s} = 2500\text{bp/s}$$

(三) 复制的终止过程：切除引物、填补空缺和连接切口

原核生物基因是环状 DNA，复制是双向复制，*E. coli* 复制起始点在 82 等分位点上的 oriC，终止点在 32 等分位点的 ter(termination)，刚好把环状 DNA 分为两个半圆(图 10-11)。原核生物是单复制子复制，从起始点开始的双向复制各进行了 180°，同时在终止点上汇合。但也有些生物两个方向复制是不等速的，起始点和终止点不一定把基因组 DNA 分为两个等份。



●图 10-19　子链中的 RNA 引物被取代

齿状线代表引物

由于复制的半不连续性，在随从链上出现许多冈崎片段。每个冈崎片段上的引物是 RNA 而不是 DNA。复制的完成还包括去除 RNA 引物和换成 DNA，最后把 DNA 片段连接成完整的子链。这一过程用图 10-19 加以说明。实际上此过程在子链延长中已陆续进行，不必等到

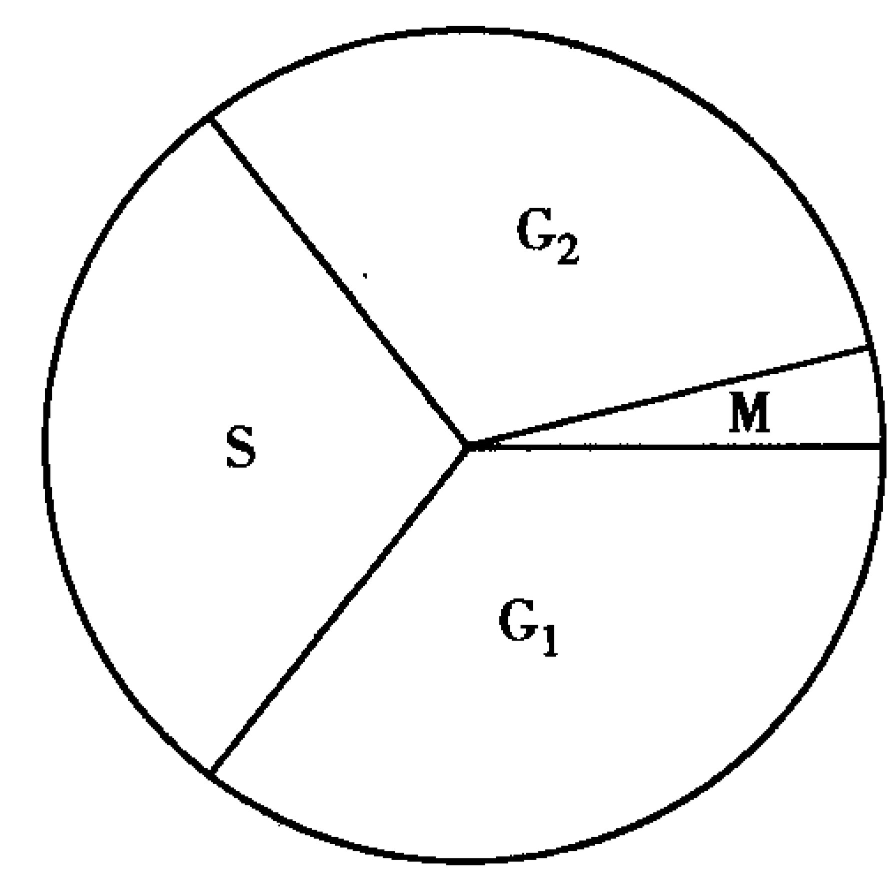
最后的终止才连接的。

引物的水解需靠细胞核内的 RNA 酶，水解后留下空隙（gap）。空隙的填补由 DNA-pol Ⅰ而不是 DNA-pol Ⅲ催化，从 5′→3′用 dNTP 为原料生成相当于引物长度的 DNA 链。dNTP 的参入要有 3′-OH，在原引物相邻的子链片段提供 3′ OH 继续延伸，就是说，由后复制的片段延长以填补先复制片段的引物空隙。填补至足够长度后，还是留下相邻的 3′-OH 和 5′-P 的缺口（nick）。缺口由连接酶连接。按照这种方式，所有的冈崎片段在环状 DNA 上连接成完整的 DNA 子链。领头链也有引物水解后的空隙，在环状 DNA 最后复制的 3′-OH 末端继续延长，即可填补该空隙及连接，完成基因组 DNA 的复制过程。

二、真核生物的 DNA 生物合成

研究真核生物复制，多采用病毒（如猿猴病毒 SV40）感染培养细胞和简单的真核生物如酵母（yeast）、爪蟾（Xenopus laevis）卵等为生物模型。对培养的肿瘤细胞复制过程研究，积累了相当有价值的调控复制过程的知识。

真核生物在细胞分裂的合成期（S 期）合成 DNA。细胞分裂的时相变化称为细胞周期（cell cycle）。典型的细胞周期分为 4 期（图 10-20），营养条件良好的培养细胞，细胞周期历程约 24 小时。



●图 10-20　哺乳类动物的细胞周期

体内活细胞周期长短相差悬殊，关键在 G_1 期进入 S 期。不少细胞活性物质例如生长因子、环核苷酸类、氨基酸、某些离子和代谢物，都能诱发细胞从 G_1 期进入 S 期。在 S 期，胞内 dNTP 含量和 DNA-pol 活性均达高峰。

（一）真核生物复制的起始与原核基本相似

真核生物 DNA 分布在许多染色体上，各自进行复制。每个染色体有上千个复制子，复制的起始点很多。复制有时序性，就是说复制子以分组方式激活而不是同步启动。转录活性高的 DNA 在 S 期早期就进行复制。高度重复的序列如卫星 DNA、连接染色体双倍体的部位即中心体（centrosome）和线性染色体两端即端粒（telomere）都是 S 期的最后才复制的。

真核生物复制起始点比 *E. coli* 的 ori C 短。酵母 DNA 复制起始点含 11bp 富含 AT 的核心序列：A(T)TTTATA(G)TTTA(T)，称为自主复制序列(ARS，autonomous replication sequence)。把 ARS 克隆至基因工程载体如质粒上，可以启动其他外源基因的复制。

真核生物复制起始也是打开复制叉，形成引发体和合成 RNA 引物。但详细的机制，包括酶及各种辅助蛋白起作用的先后，尚未完全明了。

复制的起始需要 DNA-pol α 和 pol δ 参与，前者有引物酶活性而后者有解螺旋酶活性（表 10-2）。此外还需拓扑酶和复制因子（replication factor，RF）如 RFA，RFC。增殖细胞核抗原（proliferation cell nuclear antigen，PCNA）在复制起始和延长中起关键作用。PCNA 为同源三聚体，具有与 *E. coli* DNA 聚合酶Ⅲ的 β 亚基相同的功能和相似的构象，即形成闭合环形的可滑动 DNA 夹子，在 RFC 的作用下 PCNA 结合于引物-模板链；并且 PCNA 使 pol δ 获得持续合成的能力。PCNA 水平也是检验细胞增殖的重要指标。

细胞能否分裂，决定于进入 S 期及 M 期这两个关键点。G_1→S 及 G_2→M 的调节，与蛋白激酶活性有关。蛋白激酶通过磷酸化激活或抑制各种复制因子而实施调控作用。相关的激酶都有调节亚基即细胞周期蛋白（cyclin）和催化亚基即细胞周期蛋白依赖激酶（cyclin dependent kinase，CDK）。两者各有多种，而且可以交叉配伍，实现对 DNA 复制的多样化和精确的调节，见表 10-5。

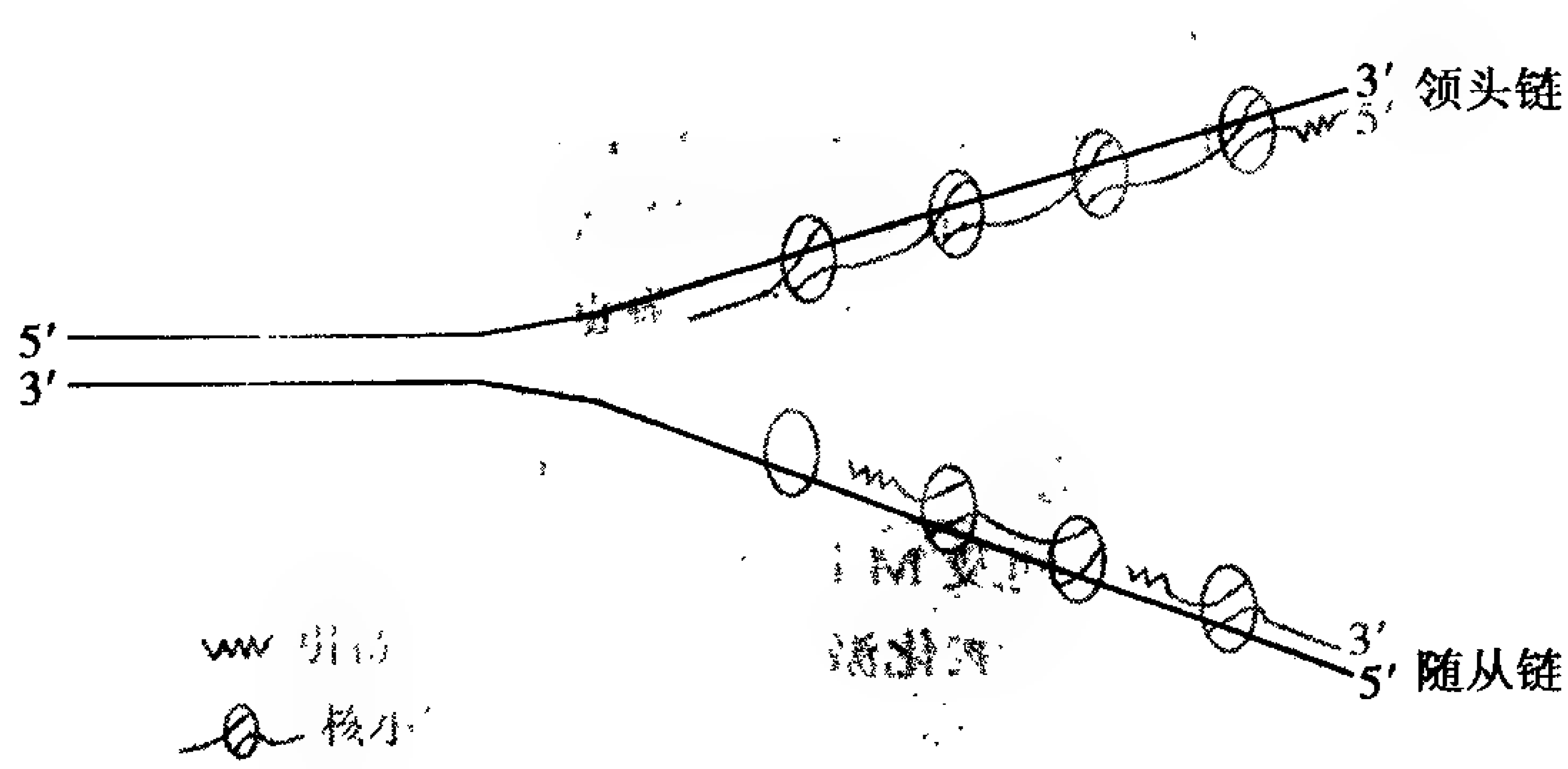
表 10-5　哺乳类动物的周期蛋白和 CDK

CDK	相匹配的周期蛋白	作用点
CDK2	Cyclin D1，D2，D3	G_1 期
	Cyclin E	G_1→S 期
	Cyclin A	S 期
CDK3 和 CDK4	Cyclin D1，D2，D3	G_2 期
CDK1（CDC2）	Cyclin A，B	G_2→M 期

哺乳类动物细胞内还发现天然抑制 CDK 的蛋白质，例如锚蛋白（ankyrin）是 CDK4 的特异性抑制物，P21 蛋白能抑制多种 CDK。锚蛋白和 P21 蛋白的活化，可阻止细胞进入 S 期进行复制，它们属抑癌蛋白类（见第二十章）。在多种肿瘤组织中发现，CDK 抑制蛋白基因的突变或缺失与肿瘤的发生相关。p21 基因表达又受广谱的抑癌基因 p53 调控。P21 蛋白除抑制 CDK 类外，还能抑制 PCNA，也就是说，它能抑制复制的起始和延长过程。P21 蛋白还参与由 p53 介导的细胞凋亡级联反应（见第二十章）。锚蛋白和 P21 蛋白的抑制或活化可使细胞周期开放或关闭，因此被形容为细胞周期的检查点（check point）蛋白。

（二）真核生物复制的延长发生 DNA 聚合酶 α/δ 转换

DNA-pol δ 和 pol α 分别兼有解螺旋酶和引物酶活性，前者延长核酸链长度的能力远比后者大，对模板链的亲和力也是 pol δ 较高。在复制叉及引物生成后，DNA-pol δ 通过 PCNA 的协同作用，逐步取代 pol α，在 RNA 引物的 3′-OH 基础上连续合成领头链。随从链引物也由 pol α 催化合成。然后由 PCNA 协同，pol δ 置换 pol α，继续合成 DNA 子链。复制子复制完成后，也需除去引物。除去引物不但需要核内 RNA 酶，还需要核酸外切酶。可见真核生物的引物除 RNA 外还有 DNA 片段作为组成成分。以前有些研究者认为 pol α 合成随从链，pol δ 合成领头链。现在认为 pol α 主要催化合成引物，随从链多次合成的引物包含有 DNA 片段。真核生物是以复制子为单位各自进行复制的，所以引物和随从链的冈崎片段都比原核生物的短。实验证明，真核生物的冈崎片段长度大致与一个核小体（nucleosome）（见第二章）所含 DNA 的量（135bp）或其若干倍相等。可见随从链的合成到核小体单位之末时，DNA-pol δ 会脱落，DNA-pol α 再引发下游引物合成，引物的引发频率是相当高的。pol α 与 pol δ 之间的转换频率大，PCNA 在全过程也要多次发挥作用。以上描述的实际是真核生物复制子内随从链的起始和延长交错进行的复制过程。领头链的连续复制，亦只限于半个复制子的长度。图 10-21 是一个复制叉，也就是半个复制子在复制中的示意图。

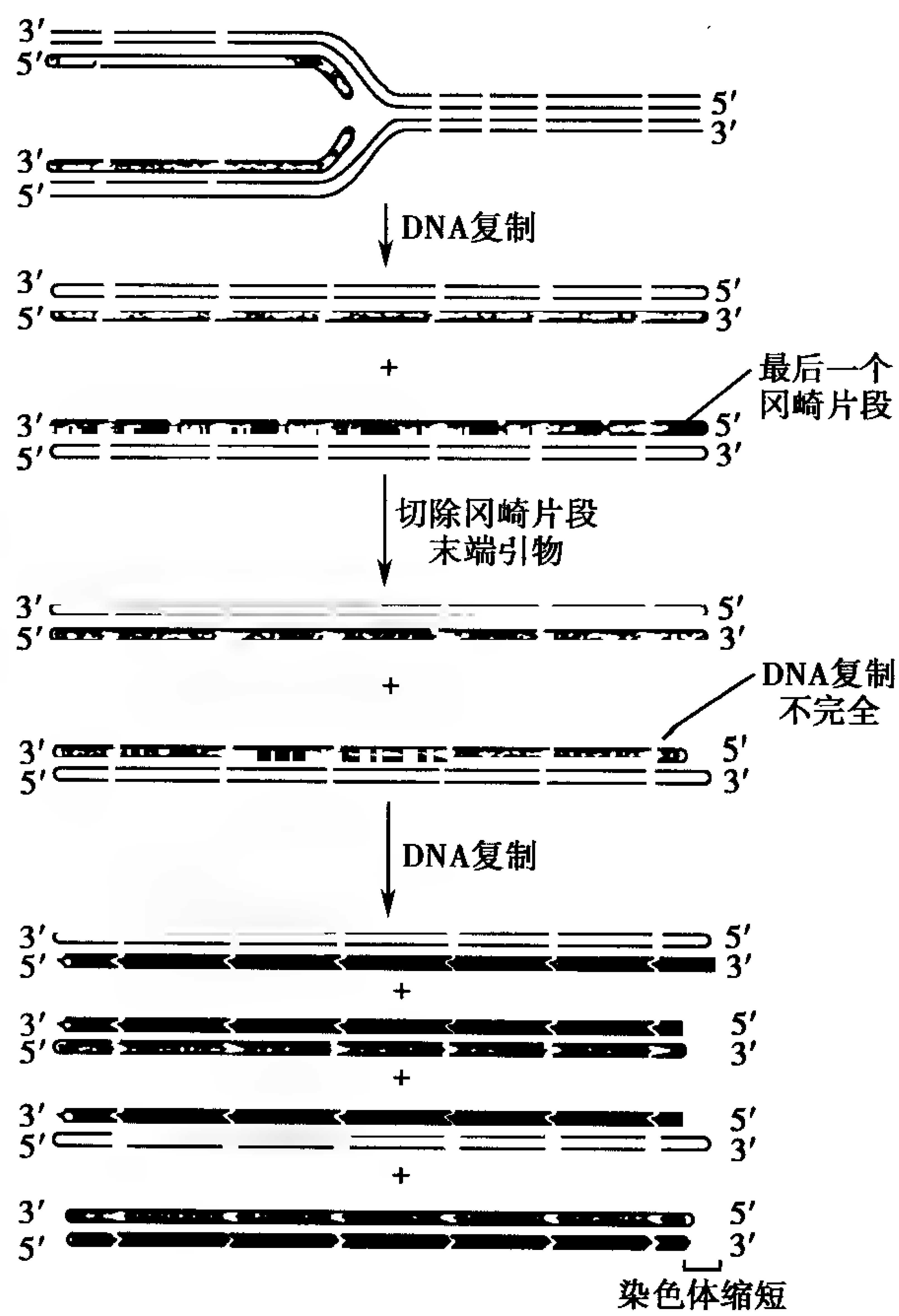


●图 10-21　真核生物复制叉的延长
当随从链延长了一个或若干个核小体的长度后，要重新合成引物

核小体的DNA与各种组蛋白是如何分开，后来又如何组合起来？现在也未完全清楚。同位素标记实验证明，原有组蛋白大部分可重新组装至新DNA链上，但在S期细胞也大量、迅速地合成组蛋白。这样才能满足新的核小体重新装配。真核生物DNA合成，就酶的催化速率而言，远比原核生物慢，估算为50dNTP/s。但真核生物是多复制子复制，总体速度是不慢的。原核生物复制速度与其培养（营养）条件有关。真核生物在不同器官组织、不同发育时期和不同生理状况下，复制速度大不一样。

（三）端粒酶参与解决染色体末端复制问题

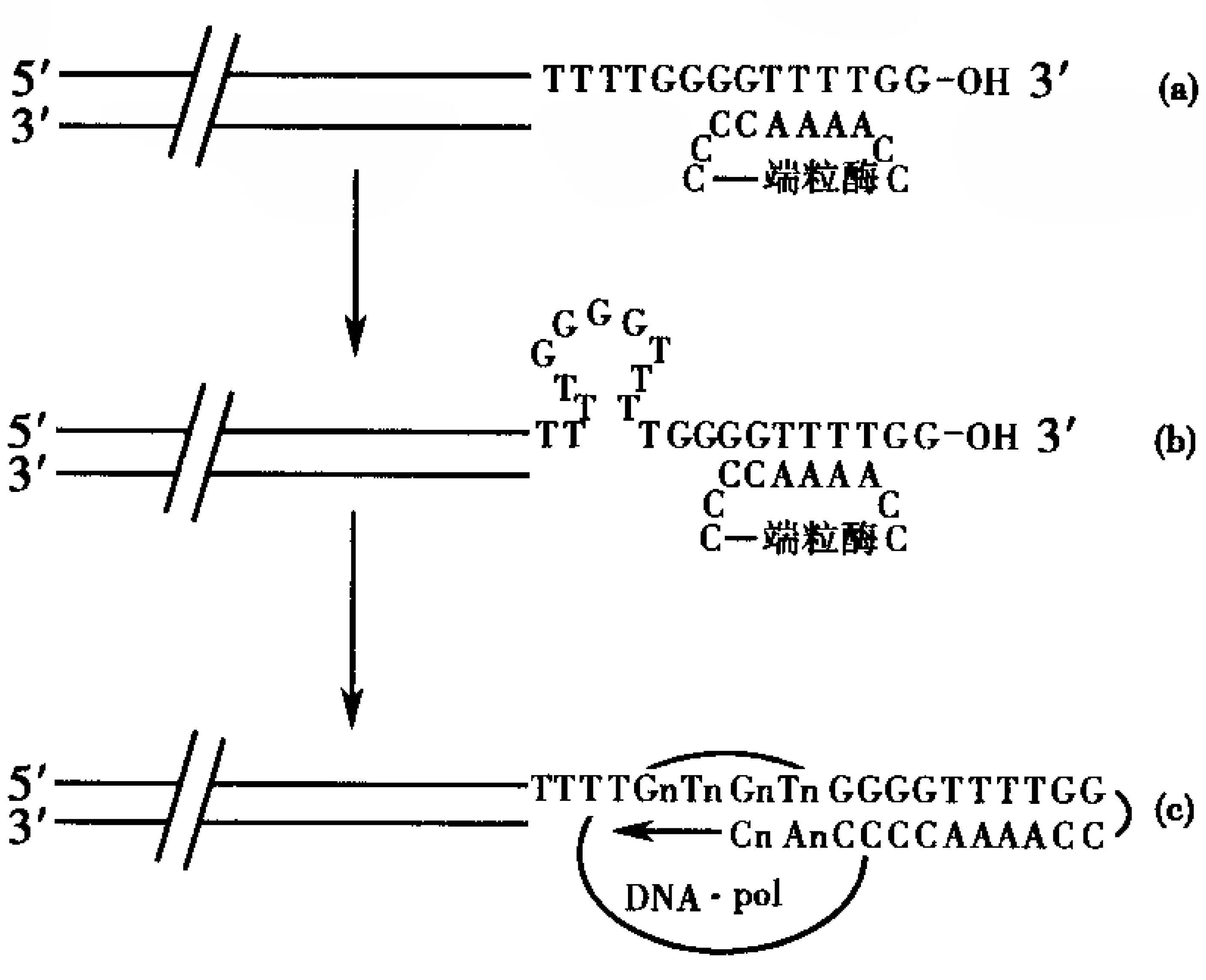
真核生物DNA复制与核小体装配同步进行，复制完成后随即组合成染色体并从G_2期过渡到M期。染色体DNA是线性结构。复制中冈崎片段的连接，复制子之间的连接，都易于理解，因为都可在线性DNA的内部完成。染色体两端DNA子链上最后复制的RNA引物，去除后留下空隙。剩下的DNA单链母链如果不填补成双链，就会被核内DNase酶解。某些低等生物作为少数特例，染色体经多次复制会变得越来越短（图10-22）。早期的研究者们在研究真核生物复制终止时，曾假定有一种过渡性的环状结构帮助染色体末端复制的完成，后来一直未能证实这种环状结构的存在。然而，染色体在正常生理状况下复制，是可以保持其应有长度的。



●图10-22 线性DNA复制的末端

端粒（telomere）是真核生物染色体线性DNA分子末端的结构。形态学上，染色体DNA末端膨大成粒状，这是因为DNA和它的结合蛋白紧密结合，像两顶帽子那样盖在染色体两端，因而得名（图10-22）。在某些情况下，染色体可以断裂，这时，染色体断端之间会发生融合或断端被DNA酶降解。但正常染色体不会整体地互相融合，也不会在末端出现遗传信息的丢失。可见，端粒在维持染色体的稳定性和DNA复制的完整性中有着重要的作用。DNA测序发现端粒结构的共同特点是富含T，G短序列的多次重复。如仓鼠和人类端粒DNA都有$(T_n G_n)_x$的重复序列，重复达数十至过百次，并能反折成二级结构。

20世纪80年代中期发现了端粒酶。1997年，人类端粒酶基因被克隆成功并鉴定了酶由三部分组成：人端粒酶RNA（human telomerase RNA，hTR，约150nt）、人端粒酶协同蛋白1（human telomerase associated protein 1，hTP1）和端粒酶逆转录酶（human telomerase reverse transcriptase，hTRT）。可见该酶兼有提供RNA模板和催化逆转录的功能。复制终止时，染色体端粒区域的DNA确有可能缩短或断裂。端粒酶通过一种称为爬行模型（inchworm model）（图10-23）的机制维持染色体的完整。其作用靠hTR$(A_n C_n)_x$辨认及结合母链DNA$(T_n G_n)_x$的重复序列并移至其3′端，开始以逆转录的方式复制；复制一段后，hTR$(A_n C_n)_x$爬行移位至新合成的母链3′端再以逆转录的方式复制延伸母链；延伸至足够长度后，端粒酶脱离母链，代之以DNA-pol，此时母链形成非标准的G—G发夹结构允许其3′-OH反折，同时起引物和模板的作用，在DNA-pol催化下完



●图 10-23 端粒酶催化作用的爬行模型
(a) 端粒酶辨认和结合母链；(b) 反转录延长母链及反折；(c) DNA-pol 复制子链

成末端双链的复制。

研究发现，培养的人成纤维细胞随着培养传代次数增加，端粒长度是逐渐缩短的。生殖细胞端粒长于体细胞，成年人细胞端粒比胚胎细胞端粒短。据上述的实验结果，至少可以认为在细胞水平，老化是和端粒酶活性下降有关的。当然，生物作为个体的老化，受多种环境因素和体内生理条件的影响，不能简单地归结为某单一因素的作用。

此外，在增殖活跃的肿瘤细胞中发现端粒酶活性增高。但在临床研究中也发现某些肿瘤细胞的端粒比正常同类细胞显著缩短。可见，端粒酶活性不一定与端粒的长度成正比。端粒和端粒酶的研究，在肿瘤学发病机制、寻找治疗靶点上，正在形成一个新的领域。

第四节 逆转录和其他复制方式

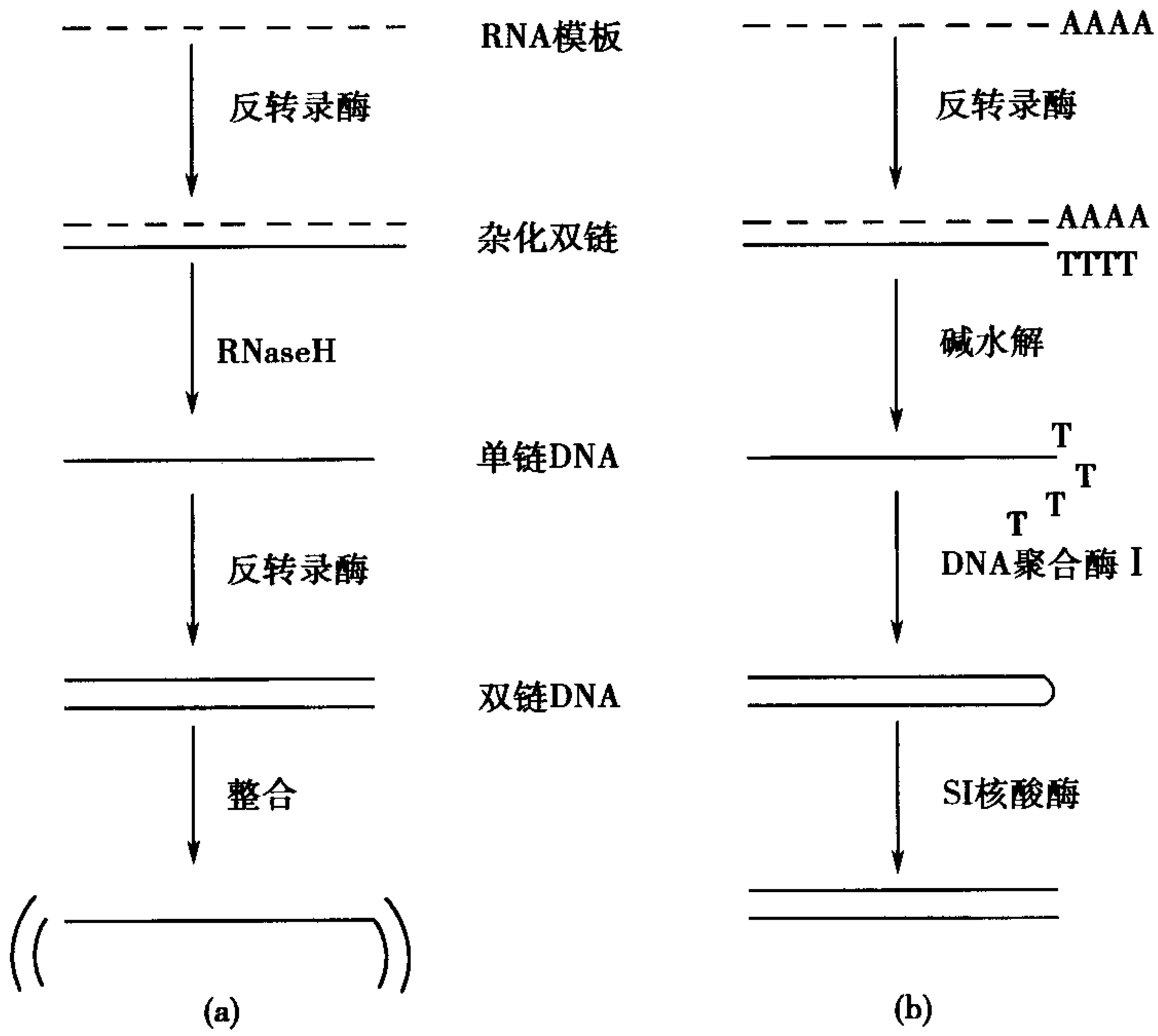
双链 DNA 是大多数生物的遗传物质。某些病毒的遗传物质是 RNA。少数低等生物如 M13 噬菌体，它的感染型只含单链 DNA。原核生物的质粒，真核生物的线粒体 DNA，都是染色体外存在的 DNA。这些非染色体基因组，采用特殊的方式进行复制。

一、逆转录病毒的基因组是 RNA，其复制方式是逆转录

RNA 病毒的基因组是 RNA 而不是 DNA，其复制方式是逆转录（reverse transcription），因此也称为逆转录病毒（retrovirus）。逆转录的信息流动方向（RNA→DNA）与转录过程（DNA→RNA）相反，也可称为反转录，是一种特殊的复制方式。1970 年，H. Temin 和 D. Baltimore 分别从 RNA 病毒中发现能催化以 RNA 为模板合成双链 DNA 的酶，称为逆转录酶（reverse transcriptase），全称是依赖 RNA 的 DNA 聚合酶（RNA dependent DNA polymerase）。

从单链 RNA 到双链 DNA 的生成可分为三步：首先是逆转录酶以病毒基因组 RNA 为模板，催化 dNTP 聚合生成 DNA 互补链，产物是 RNA/DNA 杂化双链（duplex）。然后，杂化双链中的 RNA 被逆转录酶中有 RNase 活性的组分水解，被感染细胞内的 RNase H（H=Hybrid）也可水解 RNA 链。RNA 分解后剩下的单链 DNA 再用作模板，由逆转录酶催化合成第二条 DNA 互补链（图 10-24）。逆转录酶有三种活性：RNA 或 DNA 作模板的 dNTP 聚合活性和 RNase 活性，作用需 Zn^{2+} 为辅助因子。合成反应也按照 5′→3′ 延长的规律。有研究发现，病毒自身的 tRNA 可用作复制引物。

按上述方式，RNA 病毒在细胞内复制成双链 DNA 的前病毒（provirus）。前病毒保留了 RNA 病毒全部遗传信息，并可在细胞内独立繁殖。在某些情况下，前病毒基因组通过基因重组（recombination），参加到细胞基因组内，并随宿主基因一起复制和表达。这种重组方式称为整合（integration）。前病毒独立繁殖或整合，都可成为致病的原因。



● 图 10-24 反转录酶催化的 cDNA 合成

（a）反转录病毒细胞内复制；（b）试管内合成 cDNA

二、逆转录的发现发展了中心法则

逆转录酶和逆转录现象，是分子生物学研究中的重大发现。中心法则认为：DNA 的功能兼有遗传信息的传代和表达，因此 DNA 处于生命活动的中心位置。逆转录现象说明：至少在某些生物，RNA 同样兼有遗传信息传代与表达功能。这是对传统的中心法则的挑战。20 世纪 80 年代末，又发现某些 RNA，即核酶（ribozyme，见第十一章第三节）有催化功能。过去所知有生物催化剂作用的酶，其化学本质都是蛋白质。核酶的发现，使科学界对 RNA 在生命活动中的重要性添加更深刻的认识。有人认为，RNA 在进化过程中是比 DNA 更早出现的生物大分子。

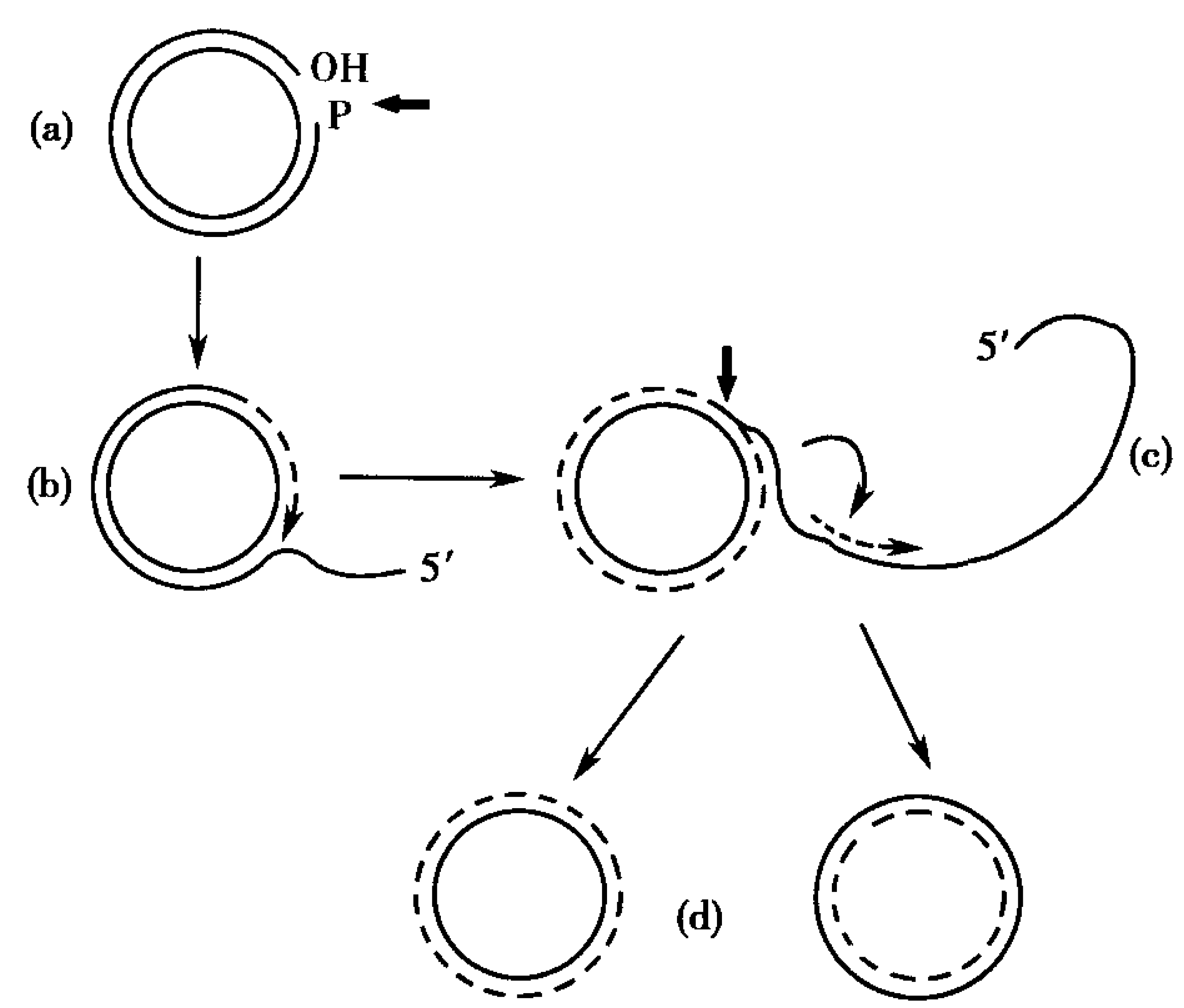
对逆转录病毒的研究，拓宽了 20 世纪初已注意到的病毒致癌理论。鸡肉瘤病毒是 1911 年发现可使动物致癌的病毒，并以发现人命名为劳氏肉瘤病毒（Rous sarcoma virus，RSV）。至 20 世纪 70 年代初，从逆转录病毒中发现了癌基因（见第二十章）。至今，癌基因研究仍是病毒学、肿瘤学和分子生物学的重大课题。人类免疫缺陷病毒（human immuno deficiency virus，HIV）也是 RNA 病毒，也有逆转录功能。目前认为，HIV 是艾滋病（acquired immuno deficiency syndrome，AIDS）的病原。

分子生物学研究还应用逆转录酶，作为获取基因工程目的基因的重要方法之一，此法称为 cDNA 法（图 10-24）。在人类这样庞大的基因组 DNA（3×10^9bp）中，要选取其中一个目的基因，有相当大难度。对 RNA 进行提取、纯化，相对较为可行。取得 RNA 后，可以通过逆转录方式在试管内操作。用逆转录酶催化 dNTP 在 RNA 模板指引下的聚合，生成 RNA/DNA 杂化双链。用酶或碱把杂化双链上的 RNA 除去，剩下的 DNA 单链再作第二链合成的模板。在试管内以 DNA-pol Ⅰ的大片段，即 Klenow 片段催化 dNTP 聚合。第二次合成的双链 DNA，称为 cDNA。c 是互补（complementary）的意思。cDNA 就是编码蛋白质的基因，通过转录又得到原来的模板 RNA。现在已利用该方法建立了多种不

同种属和细胞来源的含所有表达基因的 cDNA 文库，方便人们从中获取目的基因。

三、噬菌体 DNA 按滚环方式复制和线粒体 DNA 按 D 环方式复制

滚环复制（rolling circle replication）是某些低等生物的复制形式。例如 φX174 是单链 DNA 病毒，它的感染型 DNA 是单链的。在入侵细胞后，病毒在胞内的繁殖方式（复制型）为双链 DNA，环状双链 DNA 受有核酸内切酶活性的 A 蛋白（protein A）作用，在复制起始点打开一个缺口，形成有 3′-OH 和 5′-P 的开环单链。复制不需引物而在开链的 3′-OH 延伸，保持闭环的对应单链为模板，一边滚动一边进行连续的复制。滚动的同时，外环 5′端逐渐离环向外伸出（图 10-25）。完成一次复制后，A 蛋白把母链和子链切断，外环母链再重新滚动一次，3′-端沿母链延长，最后合成两个子双环。

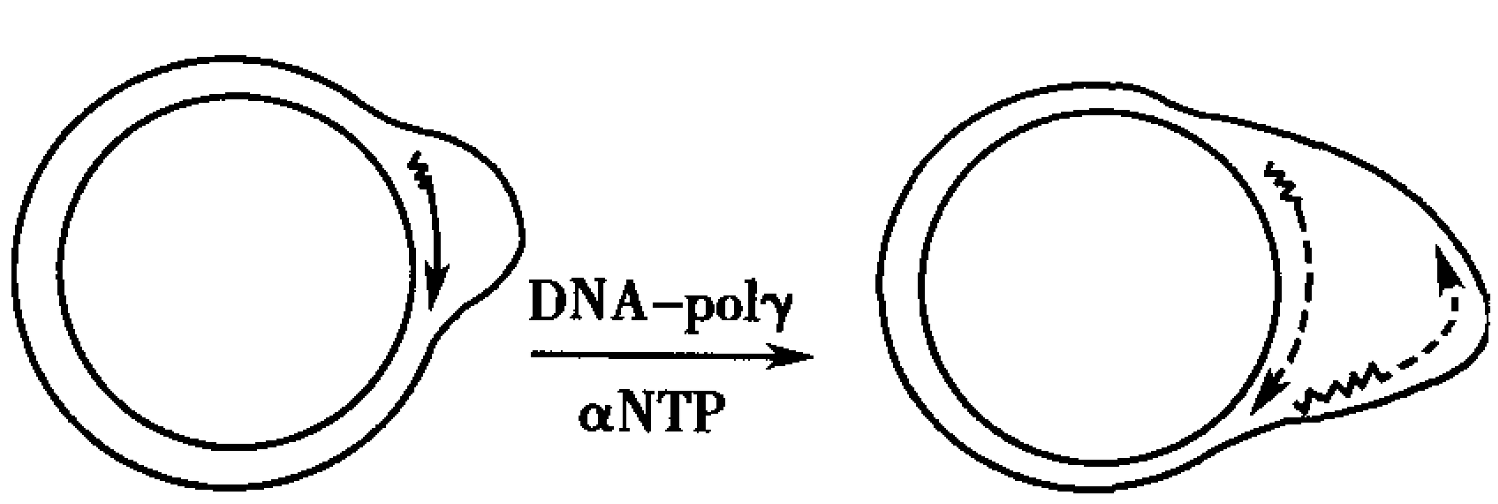


● 图 10-25　滚环复制示意图

(a) 箭头示 A 蛋白打开外环；(b) 外环以内环为模板，沿缺口 3′-OH 延长子链（虚线）；(c) 第一次滚动完成，A 蛋白断开子链和母链，继续延长的小段作引物；(d) 左为内环作模板，右为外环作模板的复制产物

用于 DNA 序列测定的 M13 噬菌体，感染型是 DNA 单链，感染 *E. coli* 后 M13 在细胞内复制也是滚环复制。

D-环复制（D-loop replication）是线粒体 DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）的复制形式。复制时需合成引物。mtDNA 为双链，第一个引物以内环为模板延伸。至第二个复制起始点时，又合成另一个反向引物，以外环为模板进行反向的延伸。最后完成两个双链环状 DNA 的复制(图 10-26)。复制中呈字母 D 形状而得名。D 环复制的特点是复制起始点不在双链 DNA 同一位点，内、外环复制有时序差别。



● 图 10-26　D 环复制在进行中

左：第一个引物在第一起始点上合成　右：延长至第二起始点，合成第二引物

真核生物的 DNA-pol γ 是线粒体催化 DNA 进行复制的 DNA 聚合酶。20 世纪 50 年代以前，只知道 DNA 存在于细胞核染色体。后来在细菌染色体外也发现有能进行自我复制的 DNA，例如质粒，以后就利用了质粒作为基因工程的常用载体（见第十四章）。真核生物细胞器——线粒体，也发现存在

mtDNA。人类的mtDNA已知有37个基因。线粒体的功能是进行生物氧化和氧化磷酸化(第六章)。已知有13个mtDNA基因就是为ATP合成有关的蛋白质和酶编码的。其余24个基因转录为tRNA(22个)和rRNA(2个),并不翻译成蛋白质产物。

mtDNA容易发生突变,损伤后的修复又较困难。mtDNA的突变与衰老等自然现象有关,也和一些疾病的发生有关。所以mtDNA的突变与修复,成为医学研究上引起广泛兴趣的问题。mtDNA翻译时,使用的遗传密码和通用的密码有一些差别。

第五节 DNA损伤(突变)与修复

DNA复制的保真性是维持物种相对稳定的主要因素。突变(mutation)与遗传保守性是相对立而又相互统一的自然现象,是由遗传物质结构改变引起遗传信息的改变。DNA突变具体指个别dNMP残基以至片段DNA在构成、复制或表型功能的异常变化,也称为DNA损伤(DNA damage)。

DNA损伤修复与乳腺癌

DNA修复基因的改变会导致突变率增加,从而大大增加个体对癌症的易感性。编码参与DNA损伤核苷酸切除修复、错配修复、重组修复的基因缺陷均与人的癌症发生相关联,DNA损伤修复是一件生死攸关的事情。每年在北美洲大约有180000女性被诊断为乳腺癌,大约1/5是家族性的或遗传因素引起的,还有1/3的患者则是因为两个编码同类蛋白的基因brca1或brca2发生突变而引发。

BRCA这类蛋白质对于修复损伤DNA的双链缺口(double strand breaks, DSB)是必需的。在细胞中,BRCA2与真核RecA同族体RAD51形成复合物。BRCA2还可特异性结合BRCA1形成异源二聚体。当暴露在电离辐射时,这三种DNA修复蛋白在细胞间期的核内聚集。推测这些聚集促进了基因组内DSBs的修复。BRCA蛋白家族起的作用至关重要,当brca1或brca2基因的一个或两个拷贝有缺陷时,其修复DSBs的能力丧失,最终导致更高频率的突变。在真核细胞中,一些新突变可能会使细胞逃脱细胞周期所强加的严格的约束,最终导致癌症。BRCA蛋白的功能好像一个哨兵,不断地对基因进行监测,对潜在的诱变损害进行鉴别和纠正。事实上,患有一种罕见的常染色体隐性遗传疾病,临床上称作范可尼综合征的病人对多个诱变物有更强的敏感性,使得这类病人对多种类型的肿瘤具有易感性。FA病人存在brca2的基因缺陷。

一、突变在生物界普遍存在

一般容易把突变误解为都是危害生命的。就其后果而言,突变在生物界的普遍存在是有积极意义的。

(一)突变是进化、分化的分子基础

从长远的生物史看,进化过程是突变的不断发生所造成的。没有突变就不可能有现今五彩缤纷的生物世界。遗传学家认为:没有突变就不会有遗传学。就一个短暂历史时期而言,人类可能未亲眼见到某一物种的自然演变而只见到长时期突变积累的结果。就同一物种而言个体差别总是存在的。大量的突变都是属于这种类型,只是目前还未能认识其发生的真正原因,因而名为自发突变或自然突变(spontaneous mutation)。

（二）只有基因型改变的突变形成 DNA 的多态性

这种突变没有可察觉的表型改变，例如在简并密码子上第三位碱基的改变，蛋白质非功能区段上编码序列的改变等，这些现象也相当普遍。多态性（polymorphism）一词用来描述个体之间的基因型差别现象。利用核酸杂交原理，可以设计各种技术用于识别个体差异和种、株间差异，并用于疾病预防及诊断。例如：法医学上的个体识别、亲子鉴定、器官移植的配型、个体对某些疾病的易感性分析，都要用 DNA 多态性分析技术。

（三）致死性的突变可导致个体、细胞的死亡

突变发生在对生命过程至关重要的基因上，可导致个体、细胞的死亡。人类常利用这些特性消灭有害的病原体。

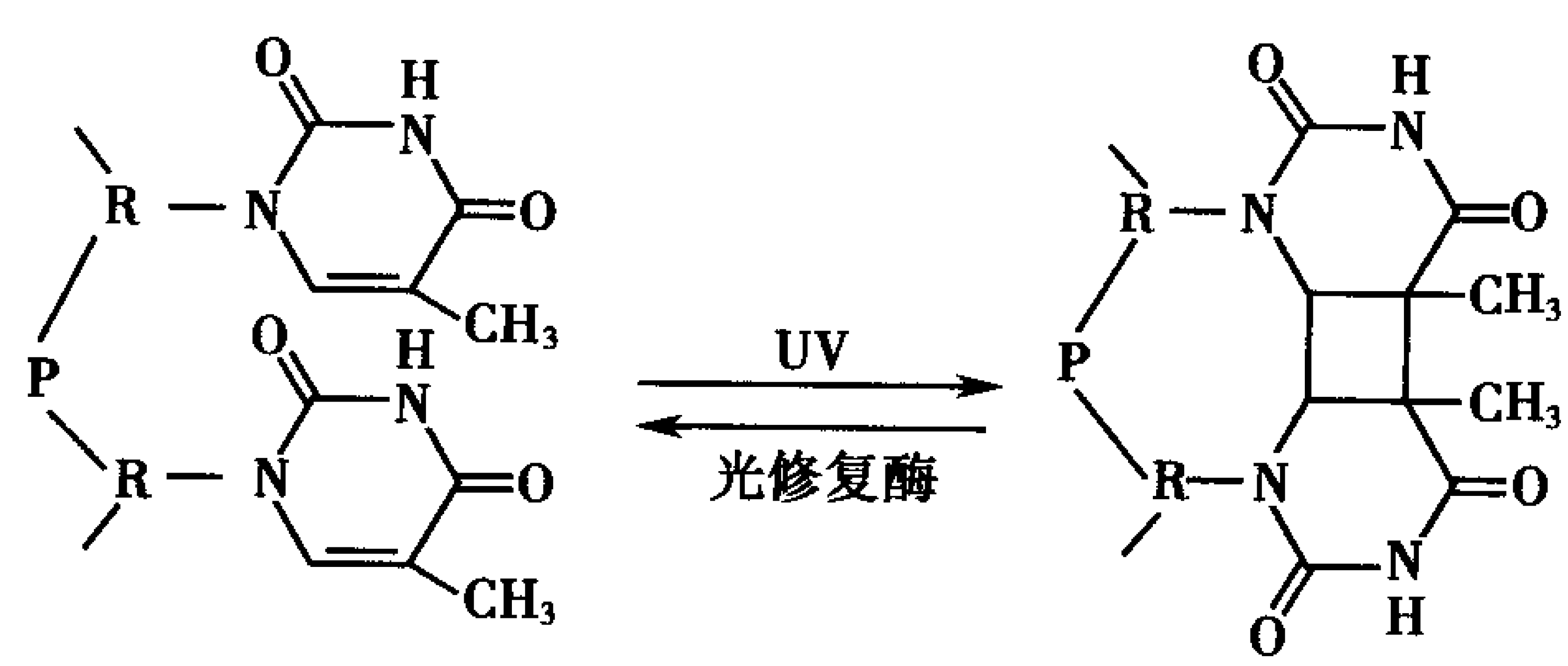
（四）突变是某些疾病的发病基础

一般人认为突变是有害的，就是指这种类型的突变。现今最详细的内科学记载了 4000 余种病种，其中 1/3 以上属遗传性疾病或有遗传倾向的病。少数已知其遗传缺陷所在，如血友病是凝血因子基因的突变，地中海贫血是血红蛋白基因突变等，其余大部分尚在研究中。有遗传倾向的疾病，包括常见的高血压病、糖尿病、溃疡病和肿瘤等，可以肯定和生活环境有关，但亦有证据表明某些基因发生了变异。不过，涉及的基因不是少数几个，而是众多基因与生活环境因素共同作用的后果。人类基因组计划（HGP）已完成核苷酸的测序后，疾病相关基因的检出和研究，是后基因组学的重要内容。

二、多种化学或物理因素可诱发突变

大量的突变属于自发突变，发生频率只不过在 10^{-9}左右。但考虑生物基因组庞大，细胞繁殖速度快，就不难理解它的作用是不可低估的。

实验室用来诱发突变，也是生活环境中导致突变的因素，主要有物理因素和化学因素。物理因素主要是指紫外线和各种辐射，其中又以紫外线照射研究得较多。紫外线（ultra violet，UV）可引起 DNA 链上相邻的两个嘧啶碱基发生共价结合，生成嘧啶二聚体或称环丁基环（cyclobutane ring）。胸苷酸二聚体（thymine dimer，TT）的结构式及其解聚反应见图 10-27。



● 图 10-27 嘧啶二聚体的形成与解聚

化学诱变剂大多数是致癌物（carcinogen）。从化工原料、化工产品和副产品、工业排放物、农药、食品防腐剂或添加剂、汽车废气等检出的致突变化合物已有 6 万多种，而且还以每年上千新品种的速度增加，择其典型的列于表 10-6。目前预防医学常用的致癌物检测法，是针对引发细菌突变的。用一种经培育的沙门菌（salmonella），它有多个缺陷：①组氨酸异养型（his-），需加组氨酸才能生长；②胞壁缺陷，化学物质易透入；③修复系统不活化。被检测的药物涂布于培养平板上，以有或无组氨酸，有或无缺陷的菌株作比较

对照，观察各条件下菌落成活数，推算被检物是否致突变。此法称为 Ames 试验，与工作量大的动物试验比较，检出致癌物有 80%以上的符合率。

表 10-6　常见的化学诱变剂

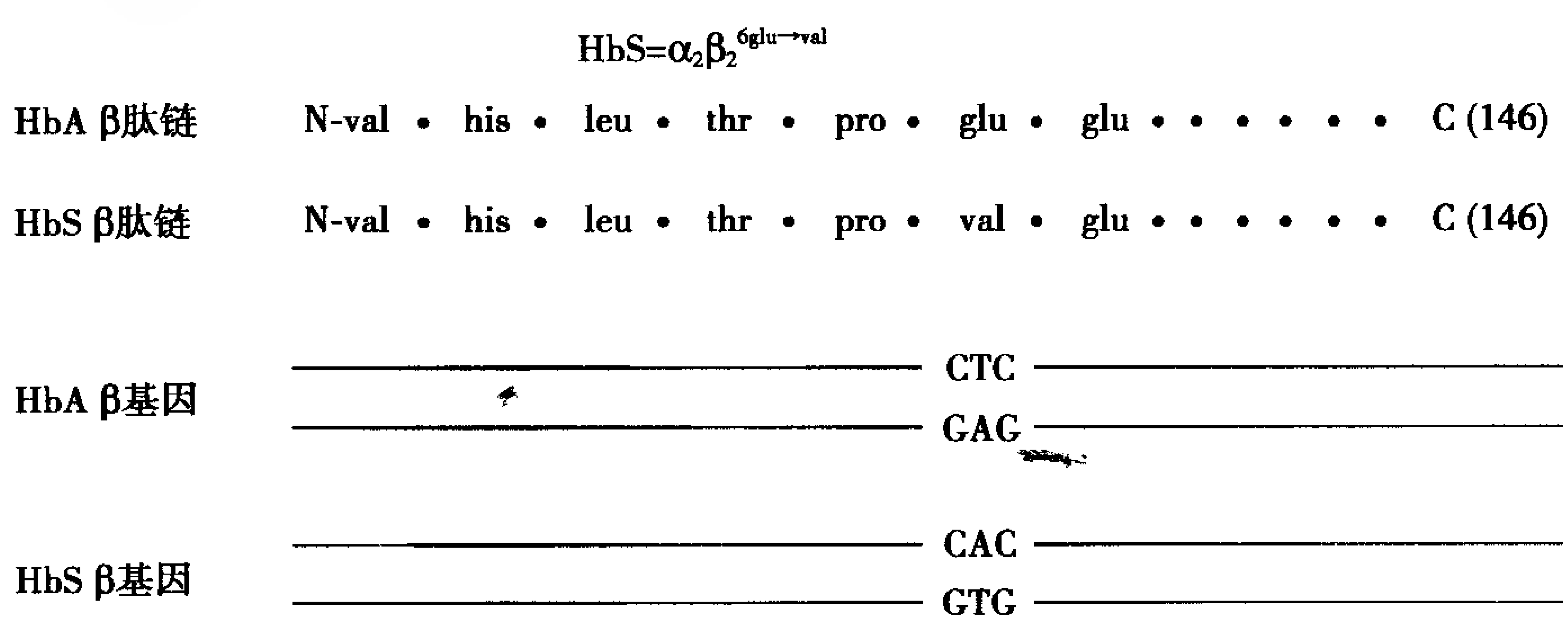
类别	化合物举例	类　别	化合物举例
稠环芳香烃	苯并芘，二甲苯并蒽	变质食物	黄曲霉素 B，色素添加剂，某些防腐剂
硝基胺和芳香胺	二甲硝基胺，N-甲基-4-氨基偶氮苯	无机物	亚硝酸盐（NO-2），砷，石棉
某些药物	烷化剂例如氮芥，环磷酰胺		

三、引起突变的分子改变类型有多种

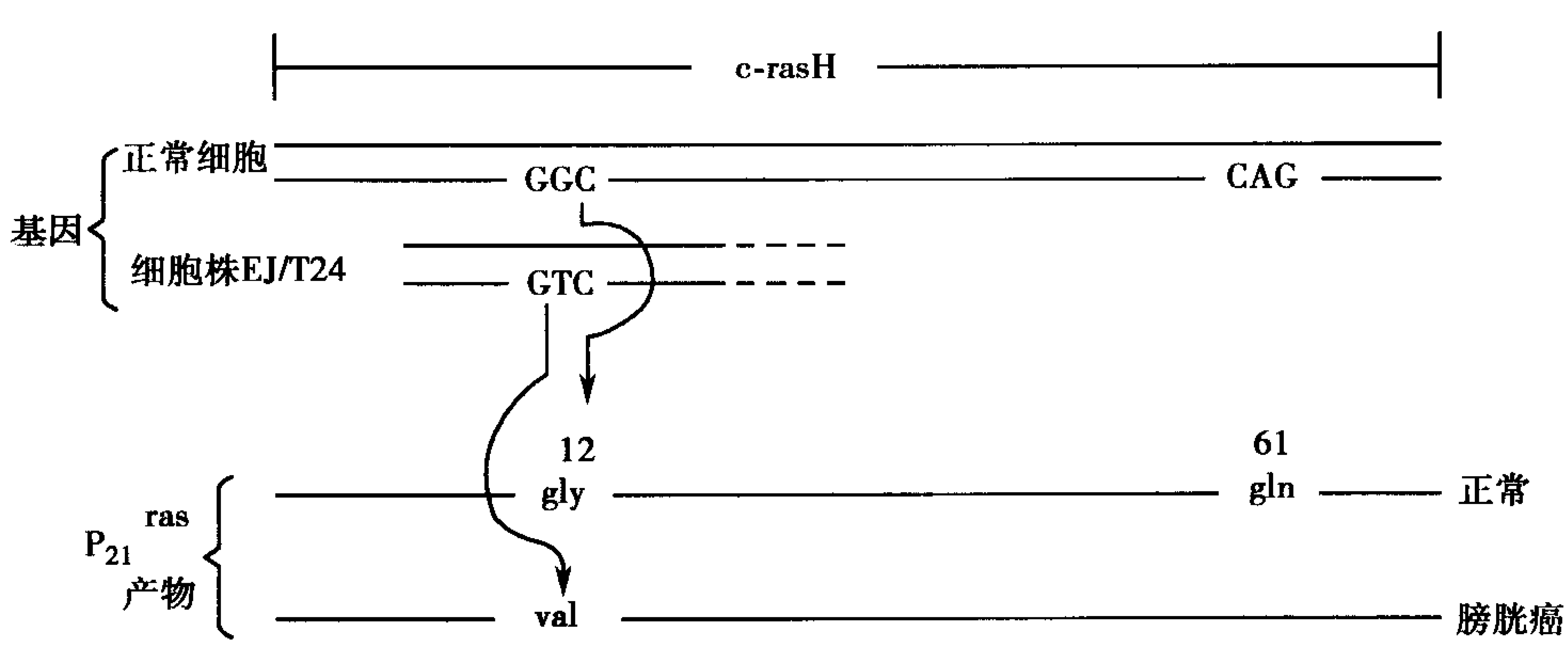
从化学本质看，突变的 DNA 分子改变可分为错配（mismatch）、缺失（deletion）、插入（insertion）和重排（rearrangement）等几种类型。缺失或插入均有可能导致框移（frame shift）突变。

（一）错配可导致编码氨基酸的改变

DNA 分子上的碱基错配又称为点突变（point mutation），自发突变和不少化学诱变都能引起 DNA 上某一碱基的置换，例如亚硝酸盐可使 C→U，原有的 C—G 配对变为 U—G，DNA 上没有 U，经复制后，C—G 最后变为 A—T 配对。点突变发生在基因的编码区，可导致氨基酸的改变。图 10-28 和图 10-29 是典型的与疾病有关的点突变例子。



●图 10-28　镰形红细胞贫血病人的 Hb 为 HbS 与正常成人 Hb（HbA）比较，只是 β 链上第 6 号氨基酸的变异
基因上的改变仅是为第 6 号氨基酸编码的密码子上的一个点突变



●图 10-29　膀胱癌细胞 c-ras H 基因点突变，基因表达产物仅 12 号氨基酸变异 gly→val

（二）缺失、插入和框移突变造成蛋白质氨基酸排列顺序发生改变

例如烷化剂使 G 碱基 N-7 位甲基化及其核苷酸的脱落而缺失。缺失或插入都可导致框移突变。框移突变是指三联体密码的阅读方式改变，造成蛋白质氨基酸排列顺序发生改变，其后果是翻译出的蛋白质可能完全不同（图 10-30）。3 个或 3n 个的核苷酸插入或缺失，不一定能引起框移突变。

5′……G C A G U A C A U G U C……
丙 缬 组 缬

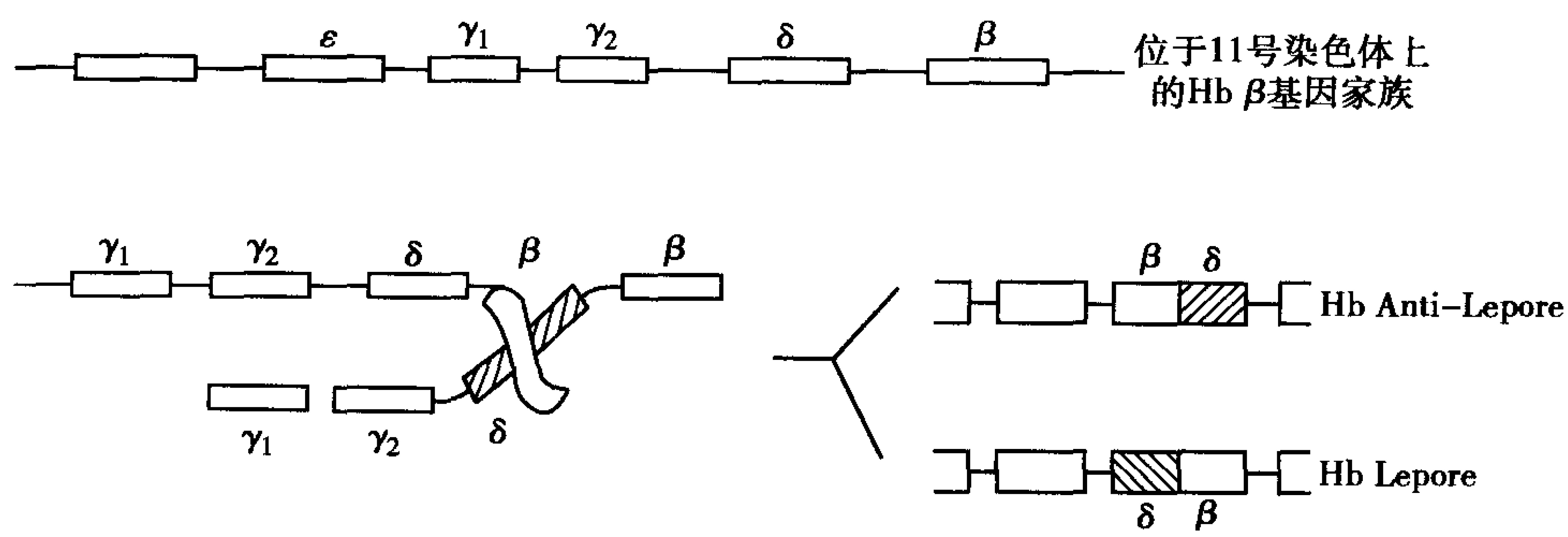
G A G U A C A U G U C……
谷 酪 蛋 丝

● 图 10-30 缺失引起框移突变

实线：原来的密码读法 虚线：缺失 C 后的密码读法

（三）重组或重排常可引起遗传、肿瘤等疾病

DNA 分子内较大片段的交换，称为重组或重排。移位的 DNA 可以在新位点上颠倒方向反置（倒位），也可以在染色体之间发生交换重组。图 10-31 表示由于血红蛋白 β 链和 δ 链两种类型的基因重排而引起的地中海贫血。



● 图 10-31 由基因重排而引起的两种地中海贫血的基因型

染色体上大片段，例如某一区带（zone）的缺失、插入或重排，是可以用细胞生物学方法从形态学上检测出的。这已成为遗传病、肿瘤等疾病诊断和研究的重要方法之一。

DNA 损伤（突变）可能造成两种结果：其一是导致复制或转录障碍（如胸腺嘧啶二聚体，DNA 骨架中产生切口或断裂）；其二是导致复制后基因突变（如胞嘧啶自发脱氨基转变为尿嘧啶），使 DNA 序列发生永久性改变。所以，必须通过进化使细胞拥有灵敏的机制，以识别和修复这些损伤，否则细胞无法维持正常代谢。

四、DNA 损伤的修复有多种类型

损伤和修复是细胞内 DNA 复制中并存的过程，DNA 修复（DNA repairing）是对已发生分子改变的补偿措施，使其恢复为原有的天然状态。生物在进化中建立和发展了多种 DNA 修复系统，修复的类型主要有错配修复（mismatch repair，见第二节）、直接修复（direct repair）、切除修复（excision repair）、重组修复（recombination repair）和 SOS 修复等。

（一）直接修复系统利用酶简单地逆转 DNA 损伤

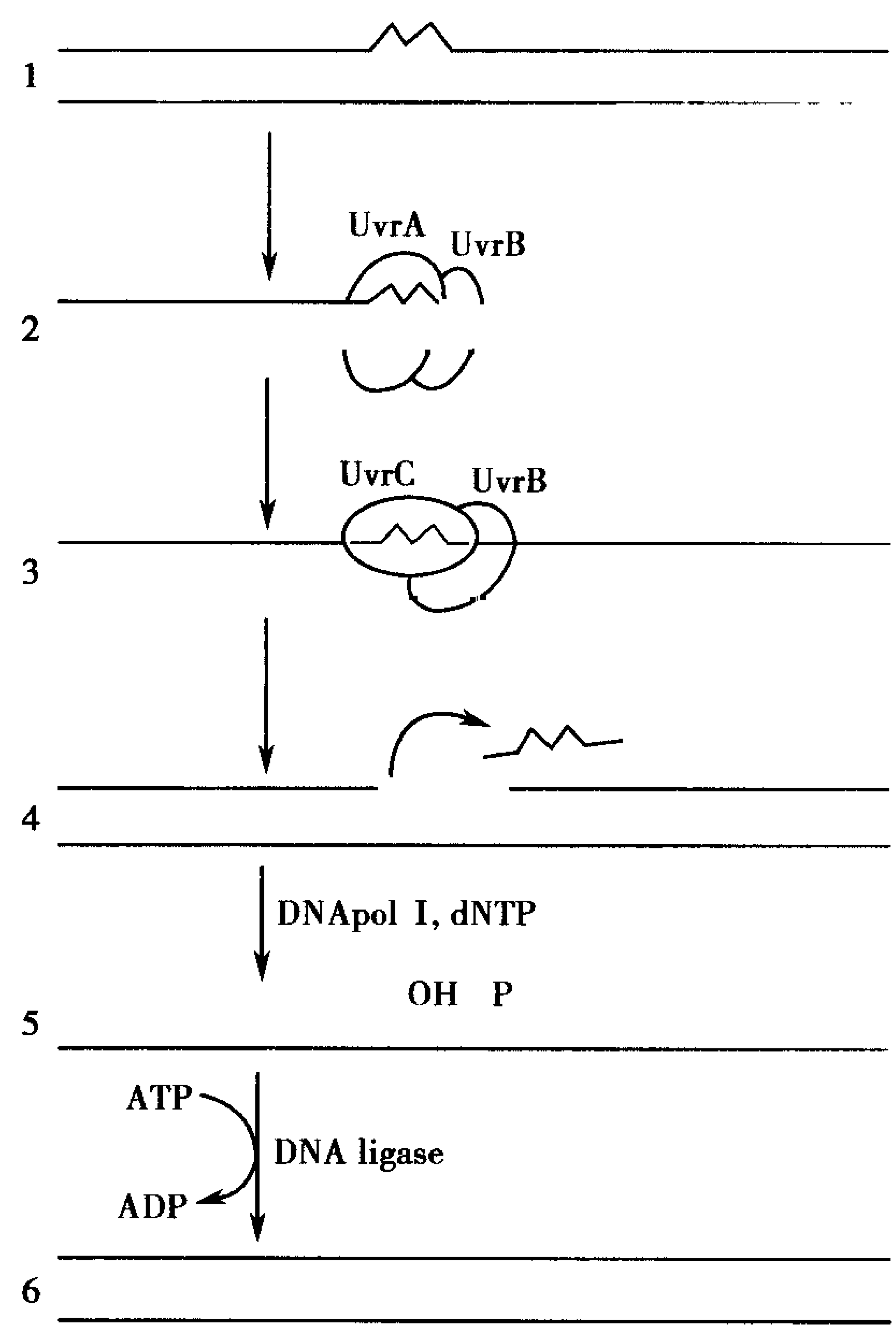
E. coli 的直接修复机制之一是光修复系统，光修复过程是通过光修复酶（photolyase）

催化完成的，仅需300～600nm波长照射即可活化，普遍存在于各种生物，人体细胞中也有发现。通过此酶作用，可使嘧啶二聚体分解为原来的非聚合状态，DNA恢复正常（图10-27）。

（二）核苷酸切除修复系统识别DNA双螺旋变形

这是细胞内最重要和有效的修复方式。其过程包括去除损伤的DNA，填补空隙和连接。后两步和复制去除DNA引物的填补和连接相似。损伤部位的去除，原核生物和真核生物需要不同的酶系统。原核生物DNA损伤的研究，早期以紫外线照射来建立损伤的模型，并因此发现与紫外线损伤及修复有关的一些基因，相应的蛋白质称为UvrA，UvrB，UvrC（uvr＝ultra voilet resistant）。现在已经清楚的是UvrA、UvrB是辨认及结合DNA损伤部位的蛋白质，UvrC有切除作用，可能还需要有解螺旋酶（helicase）的协助（图10-32）。

高等真核生物的核苷酸切除修复工作原理和原核生物大体相同，但该系统更为复杂，负责发现、切除和修复损伤的多肽链多达25个以上。人XPC蛋白负责发现DNA双螺旋中的变形，其功能相当于*E. coli*的UvrA；人XPA和XPD蛋白具有解旋酶活性，其功能相当于*E. coli*的UvrB；核酸酶ERCC1 XPF切割损伤部位5′侧，XPG切割3′侧，其功能相当于*E. coli*的UvrC。高等真核生物切除修复切割的单链DNA片段长度为24～32个核苷酸。这一片段被释放后，产生的缺口由DNA聚合酶和连接酶负责填补，亦与*E. coli*相似。



●图10-32　*E. coli*的切除修复方式

1. ⋀⋀代表DNA分子上的损伤；2. UvrA、UvrB结合损伤部位；3. UvrC置换了UvrA；4. 由UvrC切除损伤的单链；5，6. 填补空隙和连接缺口，与图10-19的方式相同

核苷酸切除修复不仅能够修复整个基因组中的损伤，而且能拯救因转录模板链损伤而暂停转录的RNA聚合酶，即参与转录偶联修复（transcription-coupled repair）。在这一过程中，参与切除修复的蛋白质被募集于暂停的RNA聚合酶。转录偶联修复的意义在于，将修复酶集中于正在转录的DNA，使该区域的损伤尽快得以修复。在这一过程中，RNA聚合酶起到损伤传感蛋白的作用。真核转录偶联修复的核心是TFⅡH。在转录起始过程中，TFⅡH的主要功能是对DNA模板起解旋作用，其亚基包括XPA和XPD。所以，TFⅡH分别参与两个独立过程：一是在核苷酸切除修复（包括转录偶联修复）时起DNA解旋酶的作用；二是在转录过程中打开DNA模板。原核细胞也存在转录偶联修复。

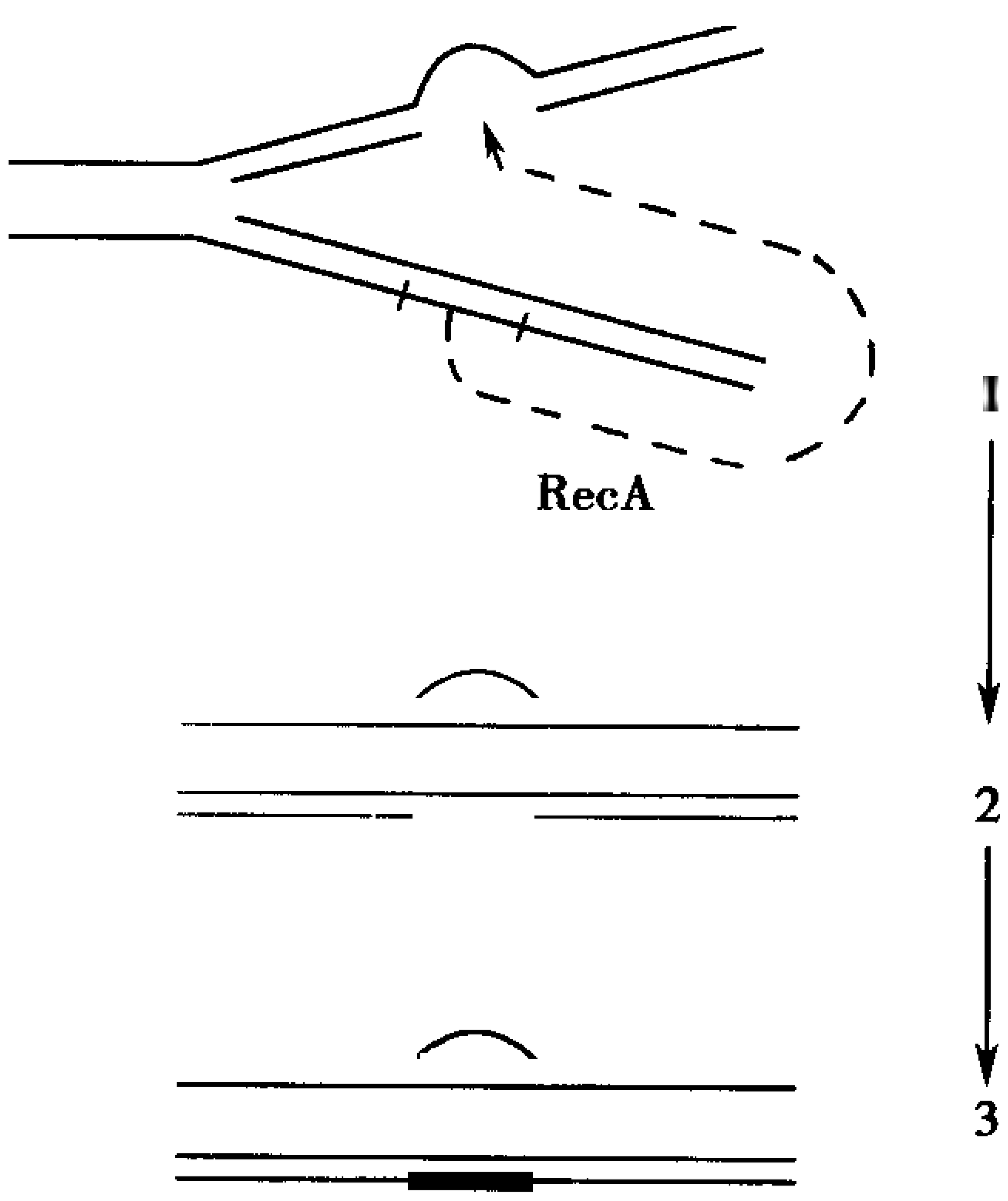
人类有一种隐性遗传病称为着色性干皮病（xeroderma pigmentosus，XP），发病机制与DNA修复有缺陷相关。研究发现了一套XP相关基因，分别命名为XPA、XPB、XPC、XPD、XPF、XPG等。XP基因的表达产物共同作用于损伤的DNA。短片段损伤，由DNA糖苷酶（DNA glycosidase）水解碱基与D核糖之间的糖苷链，生成无嘌呤/嘧啶核苷酸（apurinic/apyrimidinic acids，AP）。核酸内切酶切断带AP的磷酸二酯键，切除后的空隙由DNA-pol ε催化填补。较大损伤片段，例如数十个核苷酸，则由依赖ATP的核酸内切酶在两端切除。留下的空隙由DNA-pol ε催化填补，更长的片段由pol β填补，还

需 PCNA 参与。

真核生物修复系统除 XP 外，酵母细胞中发现一套射线抗性的 RAD（radiation）基因。RAD3 族编码的蛋白质起切除损伤 DNA 的作用。XP，RAD 和原核生物 uvr 基因各有多个，序列分析结果表明，三者之间有相当高的同源性，说明修复过程在进化上是相当保守的。

（三）重组修复系统能够修复双链断裂损伤

切除修复之所以能够精确修复，重要前提之一是损伤通常发生于 DNA 双螺旋中的一条链，而另一条链仍然贮存着正确的遗传信息。对于 DNA 双链断裂损伤，损伤面太大又不能及时修复的 DNA 也可进行复制。由错误的模板复制的子链带有错误甚至缺口。这种损伤需以重组方式修复。重组蛋白 RecA 的核酸酶活性将另一股健康的母链与缺口部分进行交换，以填补缺口。RecA 是 recA 基因的产物，是 *E. coli* 中与重组（recombination）有关的一系列基因之一。重组基因除 recA 外，还有 recB、recC 等。所谓健康母链，是指同一细胞内已完成复制的链或来自亲代的一股 DNA 链。损伤链移到已完成复制的链上，如果损伤又只发生在双链 DNA 中的一股单链，则下一轮的复制损伤链就只占 DNA 的 1/4。不断复制后，其比例就越来越低，把损伤链"稀释"掉（图 10-33）。



●图 10-33 重组修复

1. ⌒示损伤部位，虚线箭头示片段交换；2. 重组后，损伤链有缺陷单链，健康链带缺口；3. 粗短线代表健康链复制复原

（四）SOS 修复是 DNA 损伤广泛而诱发的复杂反应

DNA 损伤广泛至难以继续复制而诱发出一系列复杂反应，通过 SOS 修复，复制如能继续，细胞是可存活的。然而，DNA 保留的错误较多，导致较广泛、长期的突变。SOS 系统包括了切除、重组修复系统，即 uvr，rec 类基因及产物，还有调控蛋白如 Lex A。在 *E. coli*，所有这些基因组成一个称为调节子（regulon）的网络式调控系统。这一网络的反应特异性低，对碱基的识别、选择能力差。一般情况下，SOS 网络不表达，只在紧急状态下才整体动员。有些致癌剂能诱发 SOS 修复系统。哺乳类动物也有 SOS 修复过程，其具体组成、作用细节以及与突变、癌变有何关系，是肿瘤学研究的热点课题之一。

小 结

分子生物学中心法则阐明了遗传信息传递的规律。复制是遗传物质的代代相传，通过转录和翻译，遗传物质表达为执行生命活动功能的各种生物大分子。生物细胞内的 DNA 复制有半保留性、高保真性、半不连续性和双向性等特征，对理解复制过程及其意义都十分重要。半保留复制是遗传信息准确传代的保证，从 DNA 双螺旋结构理论上可以理解，并通过实验证实。复制的保真性还体现在酶的校读和碱基的选择功能上，复制的半不连续性可理解复制过程中领头链、随从链的区别。复制的双向性阐明复制叉的形成及其延伸、汇合。

复制以 dNTP 为原料，在 DNA-pol 催化下生成磷酸二酯键使 dNMP 逐一聚合生成 DNA 子链。原核生物有 DNA-pol Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ三种 DNA 聚合酶；真核生物有 α、β、γ、δ、ε 五种 DNA-pol，各有独特的功能。复制还需多种其他酶和蛋白质辅助因子的参与。

原核生物的复制过程已相当清楚，其起始是将 DNA 双链解开成复制叉。复制叉包括

了解螺旋酶解开的 DNA 母链双链、引发体上的引物酶催化生成的 RNA 引物和 DNA-pol Ⅲ催化延长中的子链，此外还需 DNA 拓扑异构酶理顺 DNA 链及其超螺旋结构。另外还要有单链 DNA 结合蛋白。复制的延长由引物或延长中的子链提供 3′-OH，供 dNTP 参入生成磷酸二酯键，因此子链总是从 5′向 3′方向延伸。DNA 双链走向相反而解链只可能有一个方向，因此延长中的子链有领头链和随从链之分。在电镜下观察到的复制不连续片段称为冈崎片段。复制完成前，RNA 引物须除去，留下的空隙由 DNA-pol Ⅰ催化 dNTP 的聚合而填补，片段之间的缺口由 DNA 连接酶连接使之成为连续的子链。原核生物环状 DNA 是单复制子（复制体），起始点向终止点汇合而终止复制。

真核生物复制发生于细胞周期的 S 期，起始过程需要 DNA-pol δ、α 及多种蛋白质因子。细胞周期蛋白及其相应的激酶（CDK）参与真核生物复制的调节。复制的延长和核小体组蛋白的分离和重新组装有关。染色体复制能维持应有的长度，复制的终止需要端粒酶延伸端粒 DNA。

逆转录是 RNA 病毒的复制形式。逆转录过程包括以 RNA 为模板合成单链 DNA、杂化双链上 RNA 的水解以及再以单链 DNA 为模板合成第二条 DNA 链三个步骤。在感染病毒的细胞内，逆转录酶能催化上述三步反应。逆转录现象的发现，加深了人们对中心法则的认识，拓宽了 RNA 病毒致癌、致病的研究。在基因工程操作上，还可用逆转录酶制备 cDNA。滚环复制是原核生物染色体外的基因组复制方式，D-环复制是真核生物线粒体 DNA 的复制方式。

DNA 复制过程出现错误是突变发生的原因。从生物的进化、分化来看，突变是有积极意义的。医学上重视突变研究，因为遗传病、肿瘤和很多遗传易感性疾病的发生，都与突变密切相关。从原因上说，突变除了自发发生的外，还可因各种物理、化学因素而诱发。物理因素诱发突变如常见的嘧啶二聚体。化学诱变剂种类繁多，而且往往与致癌作用有关。细胞内存在各种修复措施，使损伤的 DNA 得以复原。主要的修复方式有直接修复、切除修复、重组修复和 SOS 修复等。

（高国全　马润泉）

第十一章　RNA 的生物合成

1961 年 Weiss 和 Hurwitz 等各自在大肠杆菌的抽提液中发现了 DNA 依赖的 RNA 聚合酶（DNA-dependent RNA polymerase），揭示了 RNA 转录机制。生物体以 DNA 为模板合成 RNA 的过程称为转录（transcription），意思是把 DNA 的碱基序列转抄成 RNA。DNA 分子上的遗传信息是决定蛋白质氨基酸序列的原始模板，mRNA 是蛋白质合成的直接模板。通过 RNA 的生物合成，遗传信息从染色体的贮存状态转送至胞质，从功能上衔接 DNA 和蛋白质这两种生物大分子。

在生物界，RNA 合成有两种方式：一是 DNA 指导的 RNA 合成，也叫转录，此为生物体内的主要合成方式，也是本章介绍的主要内容。另一种是 RNA 指导的 RNA 合成（RNA-dependent RNA synthesis），也叫 RNA 复制（RNA replication），由 RNA 依赖的 RNA 聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase）催化，常见于病毒，是逆转录病毒以外的 RNA 病毒在宿主细胞以病毒的单链 RNA 为模板合成 RNA 的方式，限于篇幅本章不予叙述。

转录的知识是理解许多生物学现象和医学问题所必需的。多数细胞中有三种主要的 RNA 类型：信使 RNA（messenger RNA，mRNA）、核糖体 RNA（ribosomal RNA，rRNA）和转运 RNA（transfer RNA，tRNA），主要参与蛋白质的合成。真核细胞内还有核小 RNA（snRNA）和微小 RNA（miRNA）等，分别与 mRNA 的剪切和基因表达调控有关（参见第二章和第十三章）。某些 RNA，特别是 mRNA，在细胞中有着极为不同的生命意义。

对于 RNA 生物过程的调节，可以导致蛋白质合成速率的改变以及由此而引发的一系列代谢变化，因此了解 RNA 代谢的基本原理就甚为重要。这些原理既关系到所有生物是如何适应环境变化的，也关系到细胞结构和功能的分化机制。真核细胞中合成的 RNA 分子往往不同于原核生物中合成的 RNA 分子，特别是具有密码功能的 mRNA 分子。原核细胞的 mRNA 分子可以一边被合成一边被翻译，但哺乳动物细胞等真核细胞中的大多数 RNA 是以前体分子的形式被合成，必须经过加工才能形成成熟且具有活性的 RNA。mRNA 转录物的错误加工和剪切可引起疾病，例如某些类型的地中海贫血。

转录和复制有许多相似之处：都是酶促的核苷酸聚合过程；都以 DNA 为模板；都需依赖 DNA 的聚合酶；聚合过程都是核苷酸之间生成磷酸二酯键；都从 5′至 3′方向延伸聚核苷酸链；都遵从碱基配对规律。但相似之中又有区别（表 11-1）。

表 11-1　复制和转录的区别

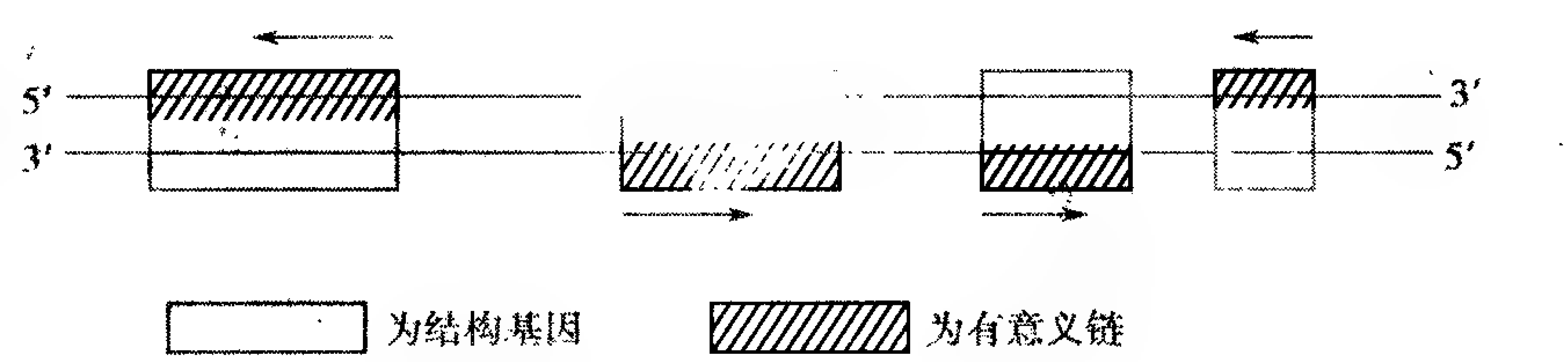
	复　制	转　录
模板	两股链均复制	模板链转录（不对称转录）
原料	dNTP	NTP
酶	DNA 聚合酶	RNA 聚合酶（RNA-pol）
产物	子代双链 DNA（半保留复制）	mRNA，tRNA，rRNA
配对	A-T，G-C	A-U，T-A，G-C

第一节 原核生物转录的模板和酶

DNA 双链只需其中一股单链作为转录模板。按碱基配对规律催化核苷酸聚合的酶是依赖 DNA 的 RNA 聚合酶（以下简称 RNA 聚合酶或 RNA-pol）。

一、原核生物转录的模板

为保留物种的全部遗传信息，基因组 DNA 全长均需复制。在庞大的基因组中，按细胞不同的发育时序、生存条件和生理需要，只有少部分的基因发生转录。能转录出 RNA 的 DNA 区段，称为结构基因（structural gene)。转录的这种选择性称为不对称转录(asymmetric transcription)，它有两方面含义：在 DNA 分子双链上，一股链作为模板指引转录，另一股链不转录；其二是模板链并非总是在同一单链上。用 RNA 对 DNA 的核酸杂交法或作 DNA、RNA 碱基序列测定比较，都可证明 DNA 分子上只有一股链可转录。图 11-1 表示，某区段上 DNA 其中一单链是模板链（template strand)，在另一区段又以其对应单链作模板。不在同一单链的模板，其转录方向相反，因为转录和复制一样，产物链是从 5′向 3′方向延长的（见图中箭头所示方向）。



●图 11-1 不对称转录
箭头示转录产物生成方向

DNA 双链中按碱基配对规律能指引转录生成 RNA 的一股单链，称为模板链；相对的另一股单链是编码链（coding strand)。转录产物若是 mRNA，则可用作翻译模板，按遗传密码决定氨基酸的序列（图 11-2)。图中用小写字母表示模板链，大写字母的一股是编码链。模板链既与编码链互补，又与 mRNA 互补，可见 mRNA 的碱基序列除用 U 代替 T 外，与编码链是一致的。文献刊出的 DNA 序列，为避免繁琐和便于查对遗传密码，一般只写出编码链。

```
5′ ···· GCAG T ACATG TC ··· 3′ ┐
                               ├ DNA
3′ ···· cgtc atgtacag ··· 5′   ┘
              ↓                  ↓ 转录
5′ ···· GC AGUACA UGUC ··· 3′    RNA
              ↓                  ↓ 翻译
N ···· Ala · Val · His · Val ··· C   肽
```

●图 11-2 DNA 模板，转录产物 RNA 的核苷酸序列，以及翻译产物肽的氨基酸序列。DNA 双链中，以小写字母代表模板链，大写字母代表编码链

总之，在 RNA 的生物合成中，其反应体系以 DNA 为模板，原料为三磷酸核糖核苷酸、RNA 聚合酶、Mg^{2+} 和 Mn^{2+}，合成方向 5′→3′。连接方式为 3′→5′磷酸二酯键。

二、RNA 合成由 RNA 聚合酶催化

（一）RNA 聚合酶能直接启动 RNA 链的合成

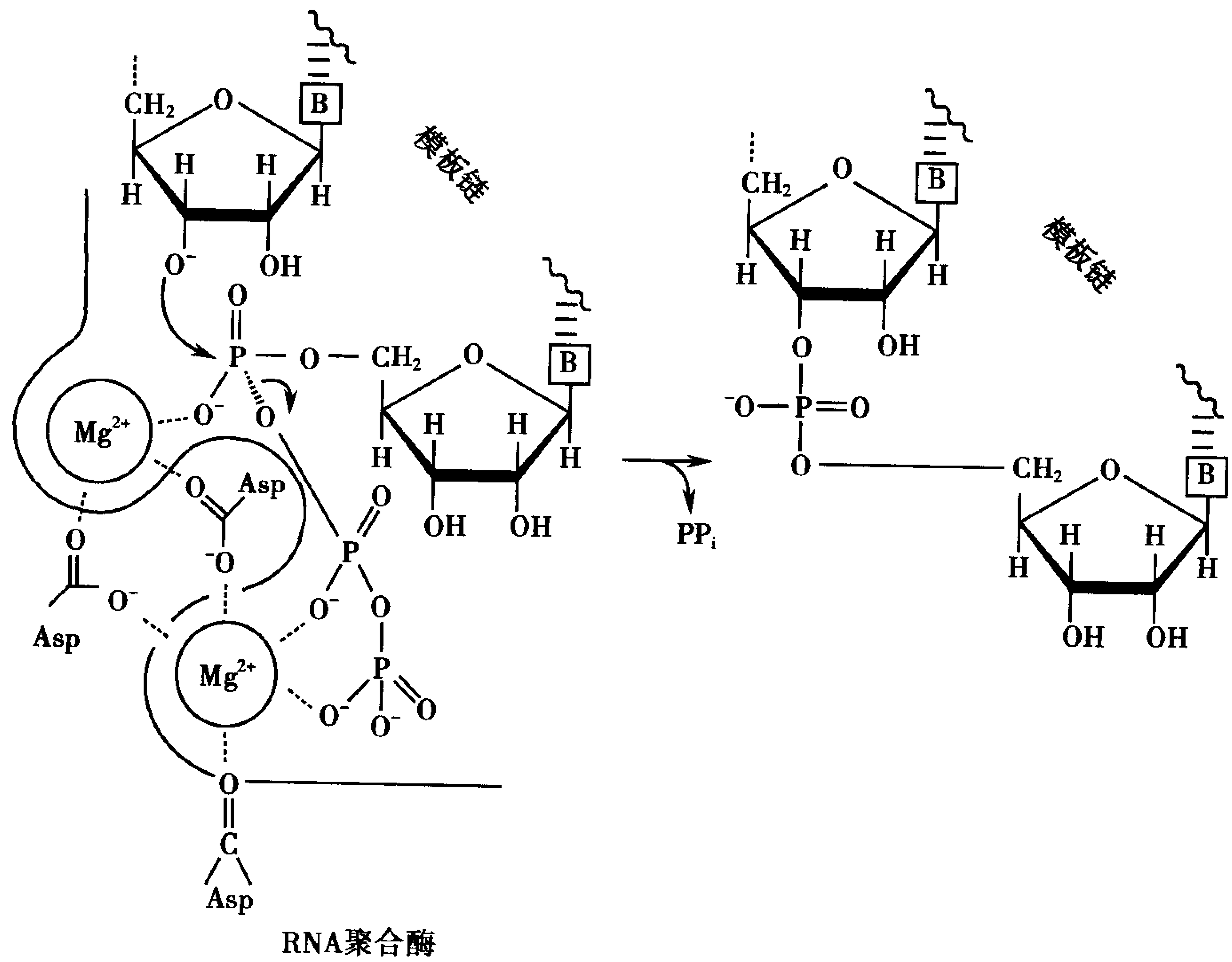
DNA 依赖的 RNA 聚合酶催化合成 RNA 是以 DNA 为模板，以 4 种核糖核苷 5′三磷酸（ATP、GTP、UTP 和 CTP）为 RNA 链中的基本单位–核苷酸的前体分子，还需要

Mg^{2+}和 Zn^{2+}。RNA 合成的化学机制与 DNA 依赖的 DNA 聚合酶催化 DNA 合成相似。RNA 聚合酶通过在 RNA 的 3′-OH 端加入核苷酸延长 RNA 链而合成 RNA。3′-OH 在反应中是亲核基团，攻击进入的核苷三磷酸的 α-磷酸，并释放出焦磷酸，总的反应可以表示为：

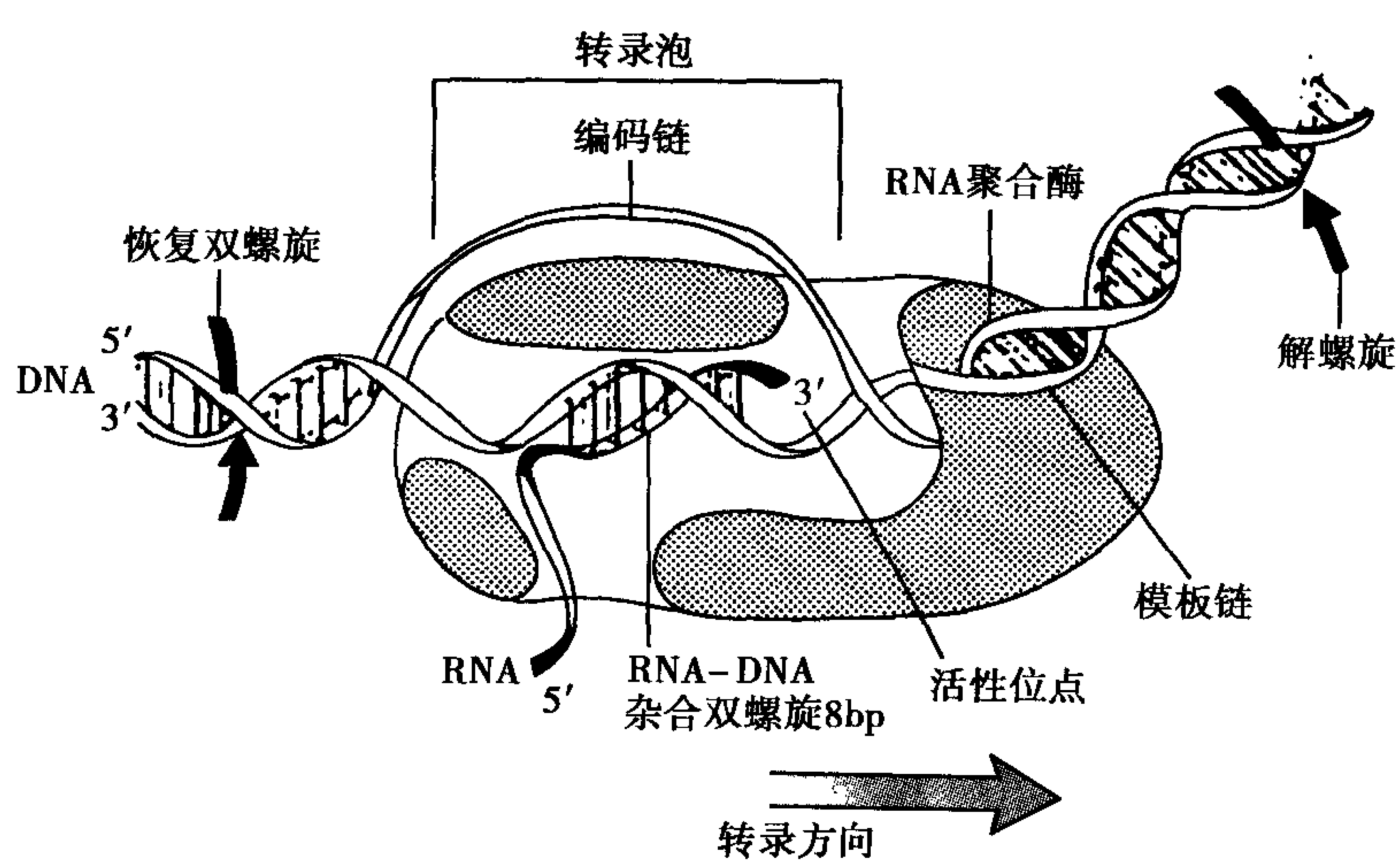
$$(NMP)_n + NTP \rightarrow (NMP)_{n+1} + PPi$$

RNA　　　　　　延长的 RNA

RNA 聚合酶和双链 DNA 结合时活性最高，但是只以双链 DNA 中的一股 DNA 链为模板。新加入的核苷酸以 Watson-Crick 碱基配对原则和模板的碱基互补（图 11-3）。



● 图 11-3 DNA 依赖的 RNA 聚合酶催化 RNA 合成的机制



● 图 11-4 *E. coli* 的 RNA 聚合酶催化的转录过程

DNA 聚合酶在启动 DNA 链延长时需要引物存在，而 RNA 聚合酶不需要引物就能直接启动 RNA 链的延长。RNA 聚合酶和 DNA 的特殊序列--启动子（promoter）结合后，就能启动 RNA 合成。启动子是 RNA 聚合酶在转录起始上游的结合序列。在 RNA 合成中首先加入核苷三磷酸并不释放出焦磷酸。RNA 链延长时，新合成的部分能暂时与模板 DNA 形成一段 8bp 的 RNA-DNA 杂合双螺旋；随着 RNA 的延长，RNA 从 RNA-DNA 杂合体解离，DNA 恢复双螺旋结构。RNA 聚合酶在合成 RNA 时，局部的 DNA 双螺旋解开，形成所谓“转录泡”（transcription bubble）。大肠杆菌（*E. coli*）的 RNA 聚合酶使 DNA 双螺旋解开的范围约 17bp，上述 8bp 的 RNA-DNA 杂合体就在其间（图 11-4）。

RNA 聚合酶的发现

早在 1955 年 M. Grunberg-Manago 和 S. Ochoa 就已报道分离出了催化合成 RNA 的酶，S. Ochoa并因阐明了 RNA 生物合成机制获得了 1959 年诺贝尔生理医学奖。1959 年美国科学家 J. Hurwitz在此工作基础上，在大肠杆菌的抽提液中找到了 RNA 聚合酶。与此同时，S. B. Weiss 在大鼠肝细胞核提取物中也发现了参与 RNA 合成的物质。J. Hurwitz 等人发现，提纯的 RNA 聚合酶在体外能够以 DNA 为模板，在加入 ATP、GTP、CTP、UTP 及 Mg^{2+} 等后合成 RNA，合成的 RNA 与 DNA 模板链完全互补。

（二）RNA 聚合酶由多个亚基组成

目前已研究得比较透彻的是大肠杆菌的 RNA 聚合酶。这是一个分子量达 480kD，由四种亚基 α_2、β、β′和 σ 组成五聚体的蛋白质。有证据表明，大肠杆菌 RNA 聚合酶还有第五个亚基（ω 亚基）存在，其功能不详。各亚基及功能见表 11-2。

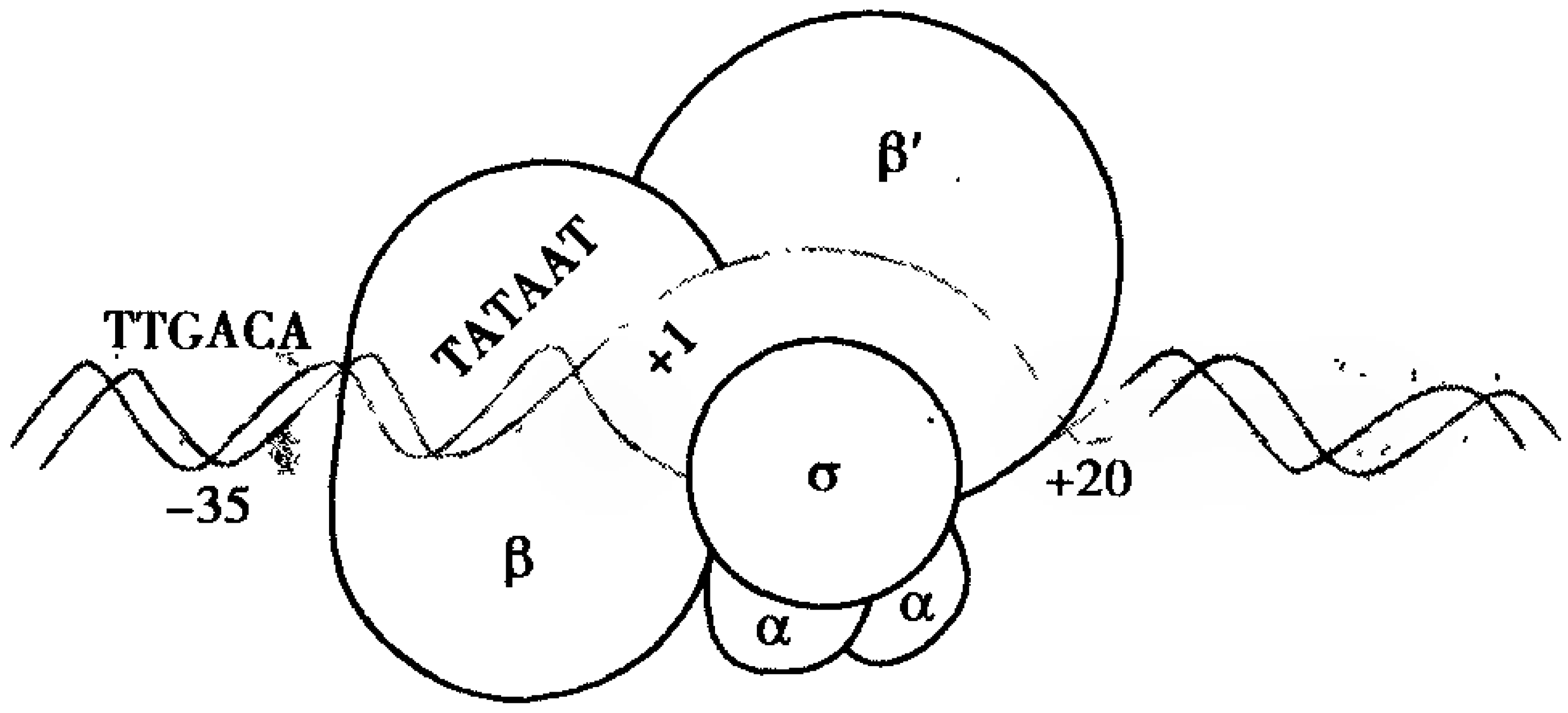
表 11-2　大肠杆菌 RNA 聚合酶组分

亚基	分子量	每分子酶中所含数目	功　能
α	36512	2	决定哪些基因被转录
β	150618	1	与转录全过程有关（催化）
β′	155613	1	结合 DNA 模板（开链）
σ	70263	1	辨认起始点

$\alpha_2\beta\beta'$（ω）亚基合称核心酶（core enzyme）。试管内的转录实验（含有模板，酶和底物 NTP 等）证明，核心酶已能催化 NTP 按模板的指引合成 RNA。但合成的 RNA 没有固定的起始位点。加有 σ（sigma）亚基的酶能在特定的起始点上开始转录。可见 σ 亚基的功能是辨认转录起始点。σ 亚基加上核心酶［$\alpha_2\beta\beta'$（ω）亚基］称为全酶（holoenzyme）。活细胞的转录起始，是需要全酶的。转录延长阶段则仅需核心酶。全酶的不同是因为 σ 亚基的不同，最常见的是 σ70，在大肠杆菌中，绝大多数启动子可被含有 σ70 因子的全酶识别并激活。图 11-5 示 RNA 聚合酶全酶在转录起始区的结合。

已发现多种 σ 亚基，并用其分子量命名区别。σ70（分子量 70kD）是辨认典型转录起始点的蛋白质。把细菌从通常培养的 37℃升温至 42℃，发现细菌合成了一套共 17 种蛋白质。这些只在外环境改变才合成的蛋白质称为热休克蛋白（heat shock proteins，Hsp）。当温度升至50℃，大部分蛋白质合成已停止，Hsp却能继续合成。Hsp的基因称为热休

克基因（*hsp*）。*hsp* 的转录起始点上游序列和一般基因不同，需另一种 σ 因子，即 σ32（分子量 32kD）辨认及启动其转录。可见，σ32 是应答热刺激而诱导产生的，它本身也属于一种 Hsp（注意首字母大、小写不同；小写代表基因名称，大写代表蛋白质名称）。真核生物也普遍存在热休克基因，也需特殊的蛋白质启动其转录，它的意义不只限于应答热刺激。例如固醇类激素胞内信号传导的蛋白质就是由热休克基因编码的。



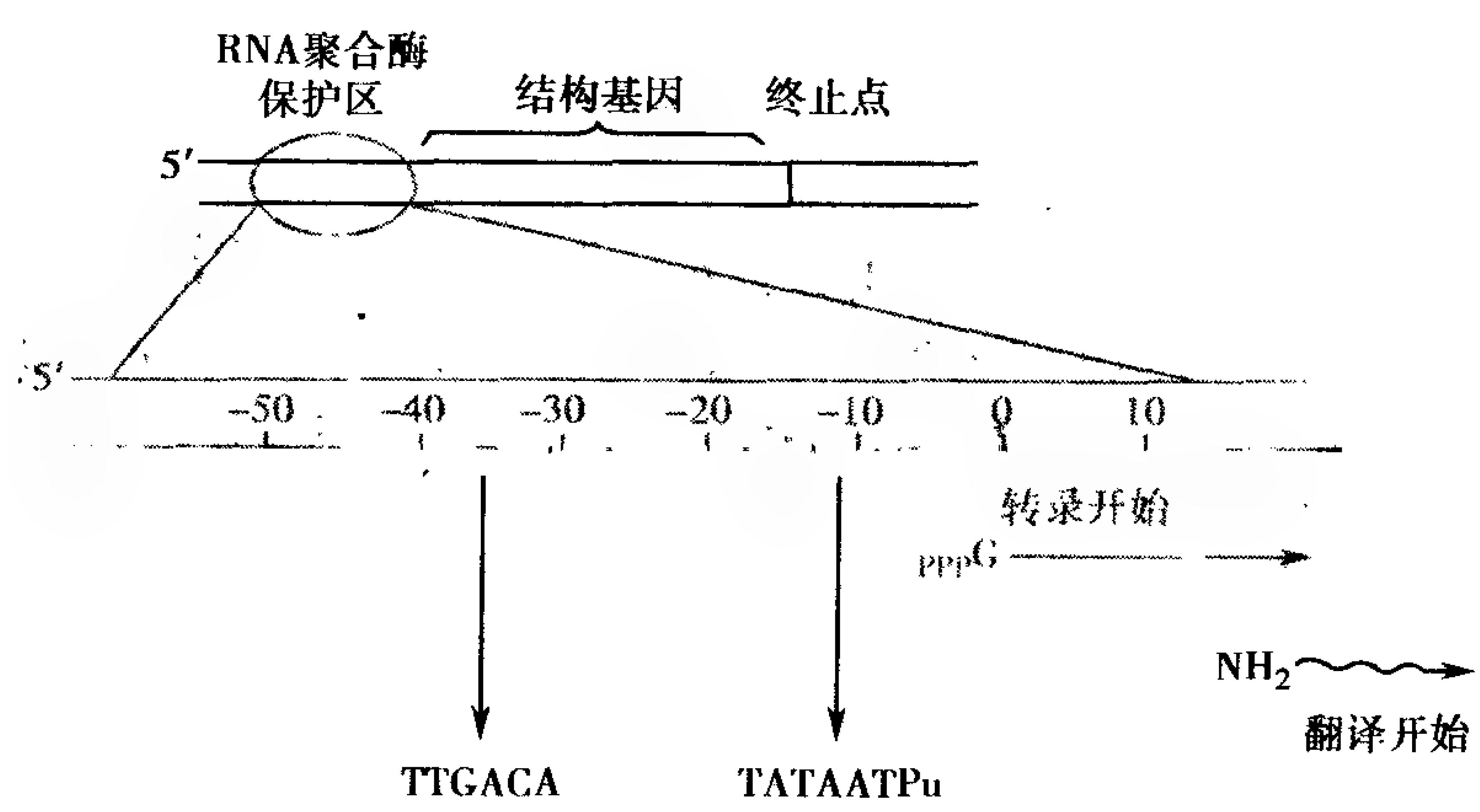
● 图 11-5　原核生物的 RNA 聚合酶全酶及其在转录起始区的结合

DNA 双链已打开，σ 因子尚未脱落

其他原核生物的 RNA 聚合酶，在结构、组成和功能上均与大肠杆菌的 RNA 聚合酶相似。原核生物的 RNA 聚合酶，都受一种抗生素特异性地抑制。利福平（rifampicin）或利福霉素是用于抗结核菌治疗的药物，它专一性地结合 RNA 聚合酶的 β 亚基。若在转录开始后才加入利福平，仍能发挥其抑制转录的作用，这说明 β 亚基是在转录全过程都起作用的。β′亚基是 RNA 聚合酶与 DNA 模板相结合相依附的组分，也参与转录全过程。α 亚基决定转录哪些类型和种类的基因，它不像 σ 亚基那样在转录延长时脱落。所以，由 α_2、β 和 β′亚基组成的核心酶是参与整个转录过程的。

三、RNA 聚合酶结合到 DNA 的启动子上启动转录

转录是不连续、分区段进行的（图 11-1）。每一转录区段可视为一个转录单位，称为操纵子（operon）（见第十三章）。操纵子包括若干个结构基因及其上游（upstream）的调控序列。调控序列中的启动子（promoter）是 RNA 聚合酶结合模板 DNA 的部位，也是控制转录的关键部位。原核生物以 RNA 聚合酶全酶结合到 DNA 的启动子上而启动转录，其中由 σ 亚基辨认启动子，其他亚基相互配合。对启动子的研究，常采用一种巧妙的方法即 RNA 聚合酶保护法：先把一段基因分离出来，然后和提纯的 RNA 聚合酶混合，再加进核酸外切酶作用一定时间后，DNA 链受核酸外切酶水解，生成游离核苷酸。但有一段 40 至 60 碱基对的 DNA 片段是完整的。这表明，这段 DNA 因与 RNA 聚合酶结合而受到保护。受保护的 DNA 位于结构基因的上游。所以这一被保护的 DNA 区段，就是被 RNA 聚合酶辨认和结合的区域，并在这里准备开始转录（图 11-6）。



● 图 11-6　用 RNA 聚合酶保护法研究转录起始区

图中部把受酶保护的 DNA 区段放大，图最下示−35 区段和−10 区段的共有序列

对超过百个原核生物基因操纵子转录上游区段进行碱基序列分析，证明 RNA 聚合酶保护区结构上有一致性（consensus）。以开始转录的 5′端第一位核苷酸位置为+1，用负数表示上游的碱基序数，发现－35 和－10 区 A-T 配对比较集中。图 11-7 是 45 个操纵子的上游测序结果。图左方 trp，lac 等是操纵子的名称。图下方 X/45 表示碱基在某位置上出现的数目，从而总结出－35 区最大一致性序列是 TTGACA。－10 区的一致性序列 TATAAT，是 1975 年由 D. Pribnow 首先发现的，称为 Pribnow 盒（Pribnow box）。－35与－10 区相隔 16～18 个核苷酸，－10 区与转录起始点相距 6 或 7 个核苷酸，均以 Nx 表示。序列分析还证明（图中未示），翻译起始密码子 AUG 在转录起始点下游，说明翻译起始点出现于转录起始点之后。

	–35区		–10区		+1
trp	TTGACA	··· N_{17} ···	TTAACT	· N_7 ·	A···
$tRNA^{trp}$	TTTACA	··· N_{16} ···	TATGAT	· N_7 ·	A···
lac	TTTACA	··· N_{17} ···	TATGTT	· N_6 ·	A···
recA	TTGATA	··· N_{16} ···	TATAAT	· N_7 ·	A···
ara	CTGACG	··· N_{18} ···	TACTGT	· N_6 ·	A···
最大一致性	TTGACA		TATAAT		
x/45	38 37 36 37 29 28		40 41 25 29 30 44		

●图 11-7　被 RNA 聚合酶保护的 DNA 区段碱基序列分析
1～5 行举出几个具体操纵子的分析结果；6，7 行示对 45 个操纵子分析后得出的一致性序列

A-T 配对相对集中，表明该区段的 DNA 容易解链，因为 A-T 配对只有两个氢链维系。比较 RNA-pol 结合不同区段测得的平衡常数，发现 RNA-pol 结合－10 区比结合－35 区相对牢固些。从 RNA-pol 分子大小与 DNA 链长的比较，可确定结合 DNA 链能达到的跨度。这些结果都能推论：－35 区是 RNA-pol 对转录起始的辨认位点（recognition site），辨认结合后，酶向下游移动，达到 Pribnow 盒，酶已跨入了转录起始点，形成相对稳定的酶-DNA 复合物，就可以开始转录（图 11-5）。

第二节　原核生物的转录过程

原核生物的转录过程可分为转录起始、转录延长和转录终止三个部分。

一、转录起始需要 RNA 聚合酶全酶

转录全过程均需 RNA 聚合酶催化，图 11-8 显示大肠杆菌的转录起始、延长的过程。起始过程需核心酶，由 σ 亚基辨认起始点，延长过程的核苷酸聚合仅需核心酶催化。

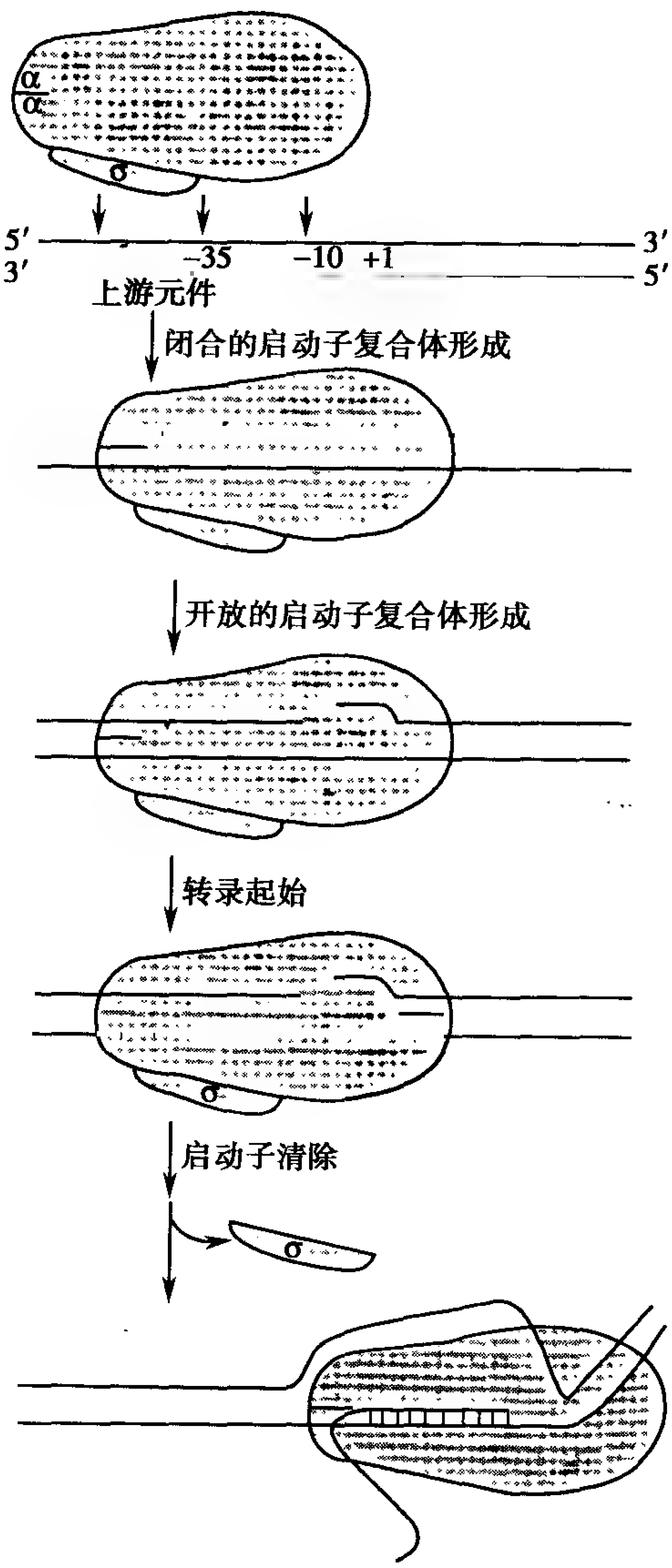
简单来说，转录的起始就是 RNA 聚合酶结合到 DNA 模板上，DNA 双链局部解开，如同图 11-5 那样，第一个 NTP 就可以加入，形成转录起始复合物。

$$转录起始复合物＝RNA\text{-}pol\ (\alpha 2\beta\beta'\sigma)\text{-}DNA\text{-}pppGpN\text{-}OH\ 3'$$

在原核生物转录的起始阶段，先由 RNA 聚合酶识别结合启动子，形成闭合转录复合体（closed transcription complex），闭合转录复合体中的 DNA 分子保持完整的双螺旋结构。闭合转录复合体再变成开放转录复合体，开放转录复合体（open transcription complex）中的 DNA 分子接近－10 区域的部分双螺旋解开。然后转录开始，转录复合体的构象发生改变，并离开启动子。当 RNA 聚合酶进入延长阶段，σ 亚基即与 RNA 聚合酶解离。原核生物需要靠 σ 因子辨认转录起始点，被辨认的 DNA 区段就是－35 区的 TTGACA 序列。在这一区段，酶与模板的结合松弛，酶移向－10 区的 TATAAT 序列并跨入了转录起始点。转录无论是起始或延长中，DNA 双链解开的范围都只在 20 个核苷酸对以下，通常是(17±1)bp。这比复制中形成的复制叉小得多。转录起始不需引物，两个与模板配

对的相邻核苷酸，在 RNA 聚合酶催化下生成磷酸二酯键就可以直接连结起来，这是 DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶分别对 dNTP 和 NTP 的聚合作用明显的区别。转录起始生成 RNA 的第一位，即 5′-端总是三磷酸嘌呤核苷 GTP 或 ATP，又以 GTP 更为常见。当 5′-GTP（5′-pppG-OH）与第二位 NTP 聚合生成磷酸二酯键后，仍保留其 5′端三个磷酸，也就是 1、2 位核苷酸聚合后，生成 5′-pppGpN-OH 3′。这一结构也可理解为四磷酸二核苷酸，它的 3′端有游离羟基，可以加入 NTP 使 RNA 链延长下去。RNA 链 5′-端结构在转录延长中一直保留，至转录完成。RNA 脱落后，仍带有这 5′端的结构。

第一个磷酸二酯键生成后，σ 亚基即从转录起始复合物上脱落，核心酶连同四磷酸二核苷酸，继续结合于 DNA 模板上，酶沿 DNA 链前移，进入延长阶段。实验证明，σ 亚基若不脱落，RNA 聚合酶则停留在起始位置，转录不继续进行。化学计量又证明，每个原核细胞，RNA 聚合酶各亚基比例为：α∶β∶β′∶σ=4000∶2000∶2000∶600，σ 因子的量在胞内明显比核心酶少。试管内的 RNA 合成实验也证明，RNA 的生成量与核心酶的加入量成正比；开始转录后，产物量与 σ 亚基加入与否无关。脱落后的 σ 因子又可再形成另一全酶，反复使用。



● 图 11-8　大肠杆菌的转录起始和延长

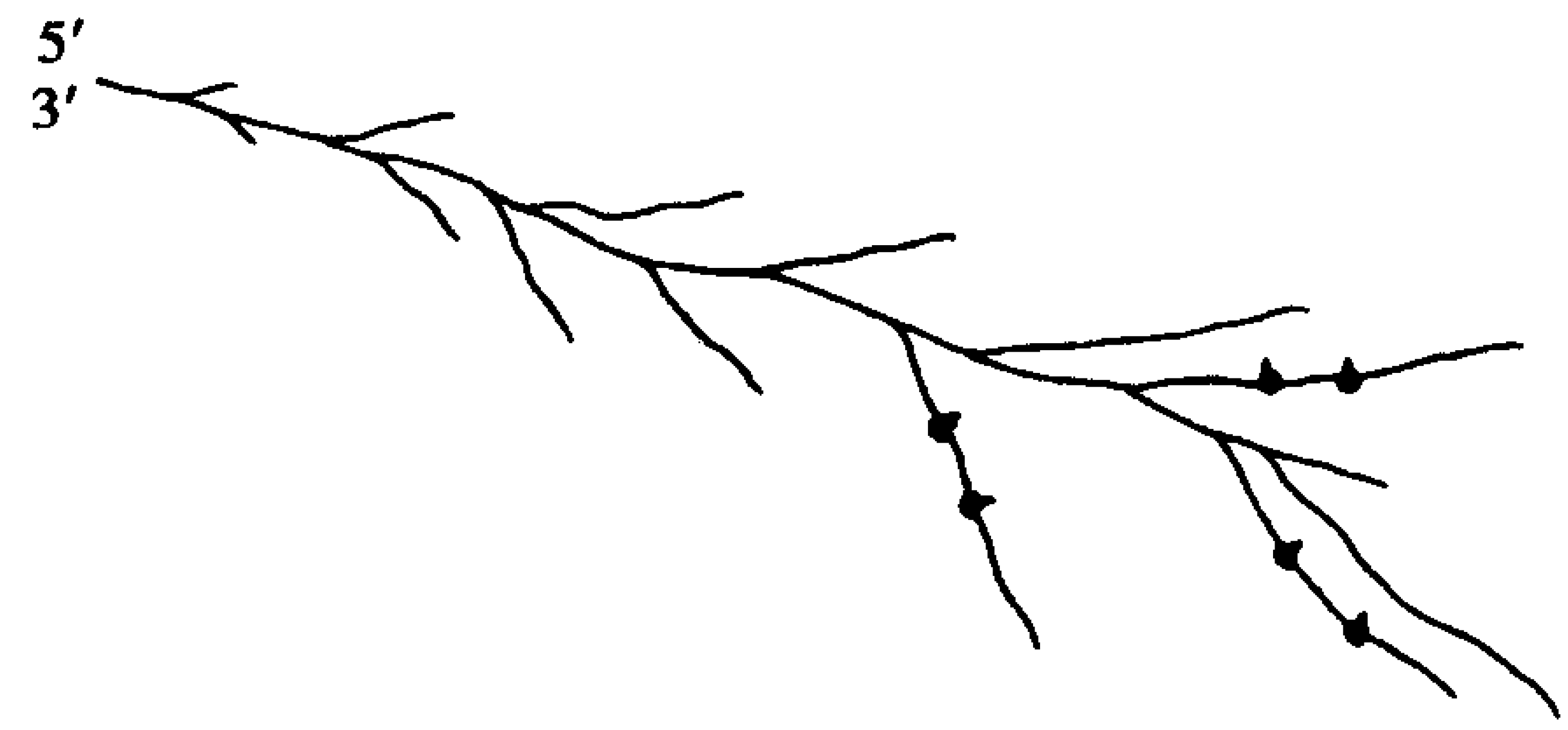
二、原核生物的转录延长时蛋白质的翻译也同时进行

σ 亚基从起始复合物上脱落后，RNA 聚合酶核心酶的构象随着发生改变。启动子区段有结构上的特异性。转录起始以后，不同基因的碱基序列大不相同，RNA 聚合酶与模板的结合是非特异性的，而且比较松弛，有利于酶迅速向下游移动。RNA 聚合酶构象变化，是与不同区段的结构相适应的。起始复合物上形成的二聚核苷酸 3′端有核糖的游离—OH 基。底物三磷酸核苷的 α-磷酸可在酶催化下与 3′-OH 起反应，生成磷酸二酯键，脱落的 β、γ 磷酸基成为无机焦磷酸。聚合生成的 RNA 链仍有 3′-OH 末端，于是按模板的指引，NMP 一个接一个按 5′→3′方向延长。遇到模板为 A 时，转录产物加入的是 U 而不是 T。RNA 聚合酶向 DNA 链下游移动，RNA 分子上 5′-pppG……结构依然保留。RNA 聚合酶分子可以覆盖 40bp 以上的 DNA 分子段落，转录解链范围小于 20bp，产物 RNA 又和模板链配对形成长约 12bp 的 RNA/DNA 杂化双链。这样由酶-DNA-RNA 形成的转录复合物，形象地称为转录空泡（transcription bubble）(图 11-4)。

转录空泡上，产物 3′-端小段依附结合在模板链。随着 RNA 链不断生长，5′端脱离模板向空泡外伸展。化学结构上 DNA/DNA 双链的结构，比 DNA/RNA 形成的杂化双链（hybrid duplex）稳定。核酸的碱基之间形成配对不外三种，其稳定性是：

$$G{\equiv}C > A{=}T > A{=}U$$

G≡C配对有3个氢键，是最稳定的。A=T配对只在DNA双链形成。AU配对可在RNA分子或DNA/RNA杂化双链上形成，是三种配对中稳定性最低的。所以已转录完毕的局部DNA双链，就必然会复合而不再打开。根据这些道理，也就易于理解空泡为什么会形成，而转录产物又是为什么向外伸出了。伸出空泡的RNA链，其最远端就是最早生成的pppGpN—。转录产物是从5′向3′延长。但如果从RNA聚合酶的移动方向来说，酶是沿着模板链的3′向5′方向或沿着编码链的5′向3′方向前进。在电子显微镜下观察原核生物的转录，可看到像羽毛状的图形（图11-9）。这种形状说明，在同一DNA模板上，有多个转录同时在进行。在RNA链上观察到的小黑点是多聚核糖体（polysome），即一条mRNA链连上多个核糖体，正在进行下一步的翻译工序，可见转录尚未完成，翻译已在进行。转录和翻译都是高效率地进行着。真核生物有核膜把转录和翻译隔成不同的细胞内区间，因此没有这种现象。



●图11-9　电子显微镜下原核生物的转录现象

三、原核生物转录终止分为依赖ρ（Rho）因子与非依赖ρ因子两大类

RNA聚合酶在DNA模板上停顿下来不再前进，转录产物RNA链从转录复合物上脱落下来，就是转录终止。依据是否需要蛋白质因子的参与，原核生物转录终止分为依赖ρ因子与非依赖ρ因子两大类。

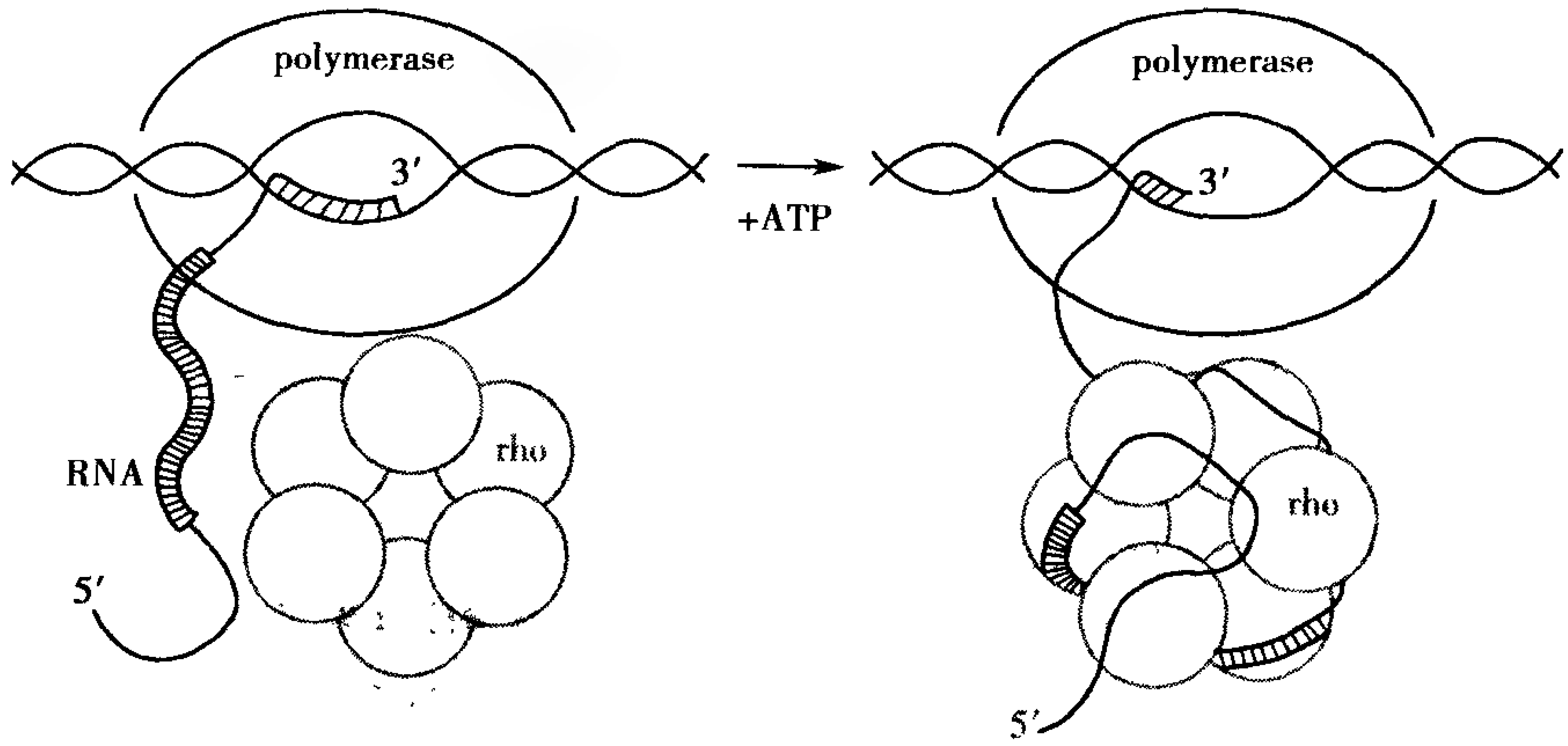
（一）依赖ρ因子的转录终止

用T4噬菌体DNA在试管内作转录实验，发现其转录产物比在细胞内转录出的产物要长。这说明转录终止点是可以跨越过而继续转录的，还说明细胞内某些因素有执行转录终止的功能。根据这些线索，1969年，J. Roberts在被T4噬菌体感染的*E. coli*中发现了能控制转录终止的蛋白质，命名为ρ因子。试管内转录体系中加入了ρ因子，转录产物长于细胞内的现象不复存在。ρ因子是由相同亚基组成的六聚体蛋白质，亚基分子量46kD。ρ因子能结合RNA，又以对poly C的结合力最强，但对poly dC/dG组成的DNA的结合能力就低得多。在依赖Rho终止的转录中，发现产物RNA 3′端有较丰富的C或有规律地出现C碱基。据此推论，转录终止信号存在于RNA而非DNA模板。后来还发现ρ因子有ATP酶活性和解螺旋酶（helicase）的活性。目前认为，ρ因子终止转录的作用是与RNA转录产物结合，结合后ρ因子和RNA聚合酶都可发生构象变化，从而使RNA聚合酶停顿，解螺旋酶的活性使DNA/RNA杂化双链拆离，利于产物从转录复合物中释放（图11-10）。

（二）非依赖ρ因子的转录终止

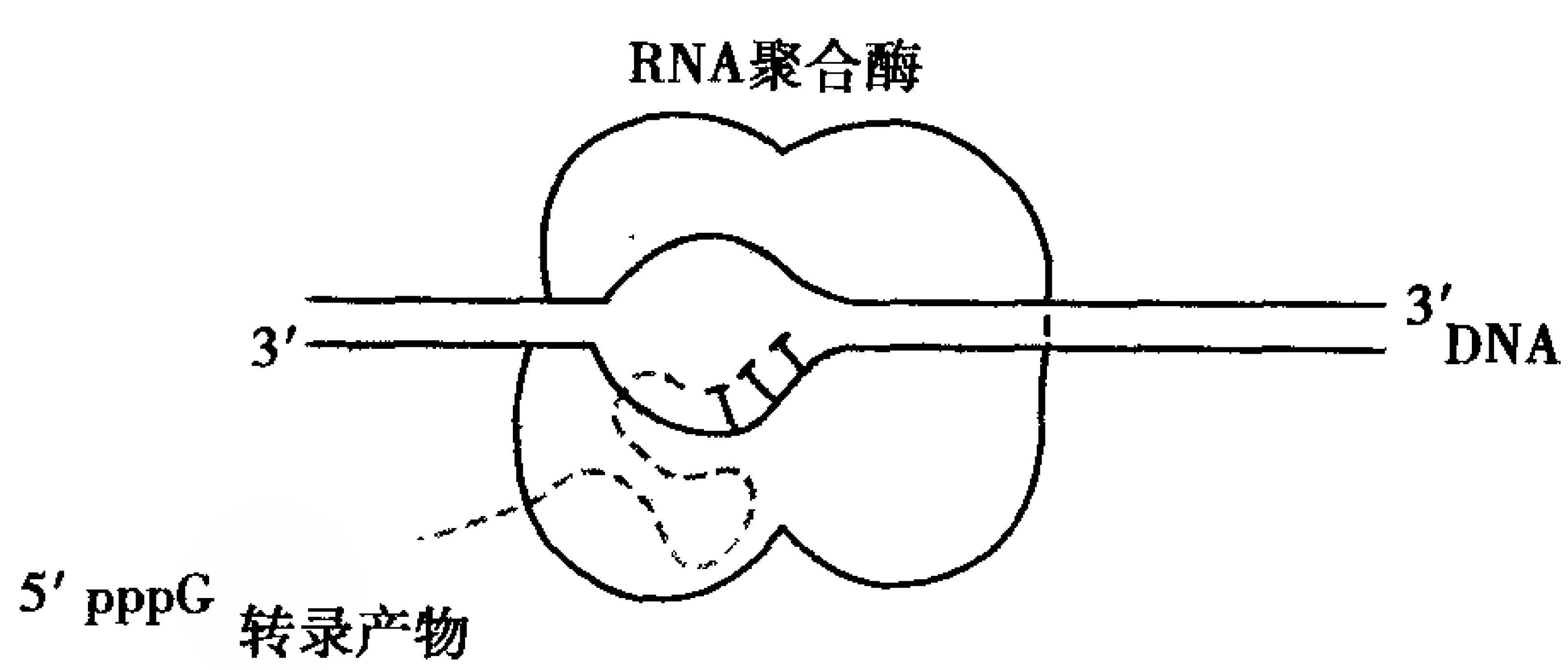
DNA模板上靠近终止处有些特殊碱基序列，转录出RNA后，RNA产物形成特殊的结构来终止转录。这就是非依赖ρ因子的转录终止。转录产物的3′末端，发现常有多个连续的U。连续的U区5′-端上游的一级结构，即接近终止区的一段碱基又可形成鼓槌状的茎环（stem-loop）或称发夹（hairpin）形式的二级结构。图11-11是大肠杆菌色氨酸操纵子结构基因的mRNA转录物3′端的转录终止结构，近终止区的转录产物形成发夹结构是非依赖ρ因子终止的普遍现象。

如图11-11，RNA链延长至接近终止区时，转录出的碱基序列随即形成茎-环结构。这种二级结构是阻止转录继续向下游推进的关键。其机制可从两方面理解：一是茎环结构



●图 11-10　ρ因子的作用原理
RNA 链上带条纹线处代表富含 C 的区段，Rho 因子结合 RNA（右），发挥其 ATP 酶及解螺旋酶活性

在 RNA 分子形成，可能改变 RNA 聚合酶的构象。注意 RNA 聚合酶的分子量大，它不但覆盖转录延长区，也覆盖部分 3′-端新合成的 RNA 链，包括 RNA 的茎环结构。由酶的构象改变导致酶-模板结合方式的改变，可使酶不再向下游移动，于是转录停止。其二，转录复合物（酶-DNA-RNA）上有局部的 RNA/DNA 杂化短链。RNA 分子要形成自己的局部双链，DNA 也要复原为双链，杂化链形成的机会不大，本来不稳定的杂化链更不稳定，转录复合物趋于解体。接着一串寡聚 U 是使 RNA 链从模板上脱落的促进因素。因为所有的碱基配对中，以 rU/dA 配对最为不稳定。



●图 11-11　大肠杆菌色氨酸操纵子结构基因的转录终止模式

第三节　真核生物 RNA 的生物合成

转录调控是基因表达调控的关键点（第十三章），也是当今生命科学研究的热点问题。了解真核生物的转录过程，是研究转录调控的重要基础。真核生物的转录过程比原核复杂。真核生物和原核生物的 RNA 聚合酶种类不同，结合模板的特性不一样。原核生物 RNA 聚合酶可直接结合 DNA 模板，而真核生物 RNA 聚合酶需与辅助因子结合后才结合模板，所以两者的转录起始过程有较大区别，转录终止也不相同。

一、真核生物有三种 DNA 依赖性 RNA 聚合酶

真核生物具有 3 种不同的 RNA 聚合酶，分别是 RNA 聚合酶Ⅰ（RNA PolⅠ）、RNA 聚合酶Ⅱ（RNA PolⅡ）和 RNA 聚合酶Ⅲ（RNA Pol Ⅲ）。RNA 聚合酶Ⅰ位于细胞核的核仁（nucleolus），催化合成 rRNA 的前体，rRNA 的前体再加工成 28S、5.8S 及 18S rRNA。RNA 聚合酶Ⅲ位于核仁外，催化转录编码 tRNA、5SrRNA 和小 RNA 分子的基因。RNA 聚合酶Ⅱ在核内转录生成 hnRNA，然后加工成 mRNA 并输送给胞质的蛋白质合成体系。mRNA 是各种 RNA 中寿命最短、最不稳定的，需经常重新合成。在此意义上说，RNA-polⅡ是真核生物中最活跃的 RNA 聚合酶。RNA 聚合酶Ⅱ也合成一些参与

RNA 剪接的核小 RNA。真核细胞的 3 种 RNA 聚合酶不仅在功能和理化性质上不同，而且对一种毒蘑菇含有的环八肽（cyclic octapeptide）毒素——α-鹅膏蕈碱（α-amanitine）的敏感性也不同，RNA 聚合酶Ⅰ对 α-鹅膏蕈碱不敏感；RNA 聚合酶Ⅱ对 α-鹅膏蕈碱十分敏感；RNA 聚合酶Ⅲ对 α-鹅膏蕈碱比较敏感（表 11-3）。

表 11-3　真核生物的 RNA 聚合酶

种　类	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
转录产物	45S-rRNA	hnRNA	5S-rRNA，tRNA，snRNA
对鹅膏蕈碱的反应	耐受	极敏感	中度敏感

真核生物转录过程的描绘

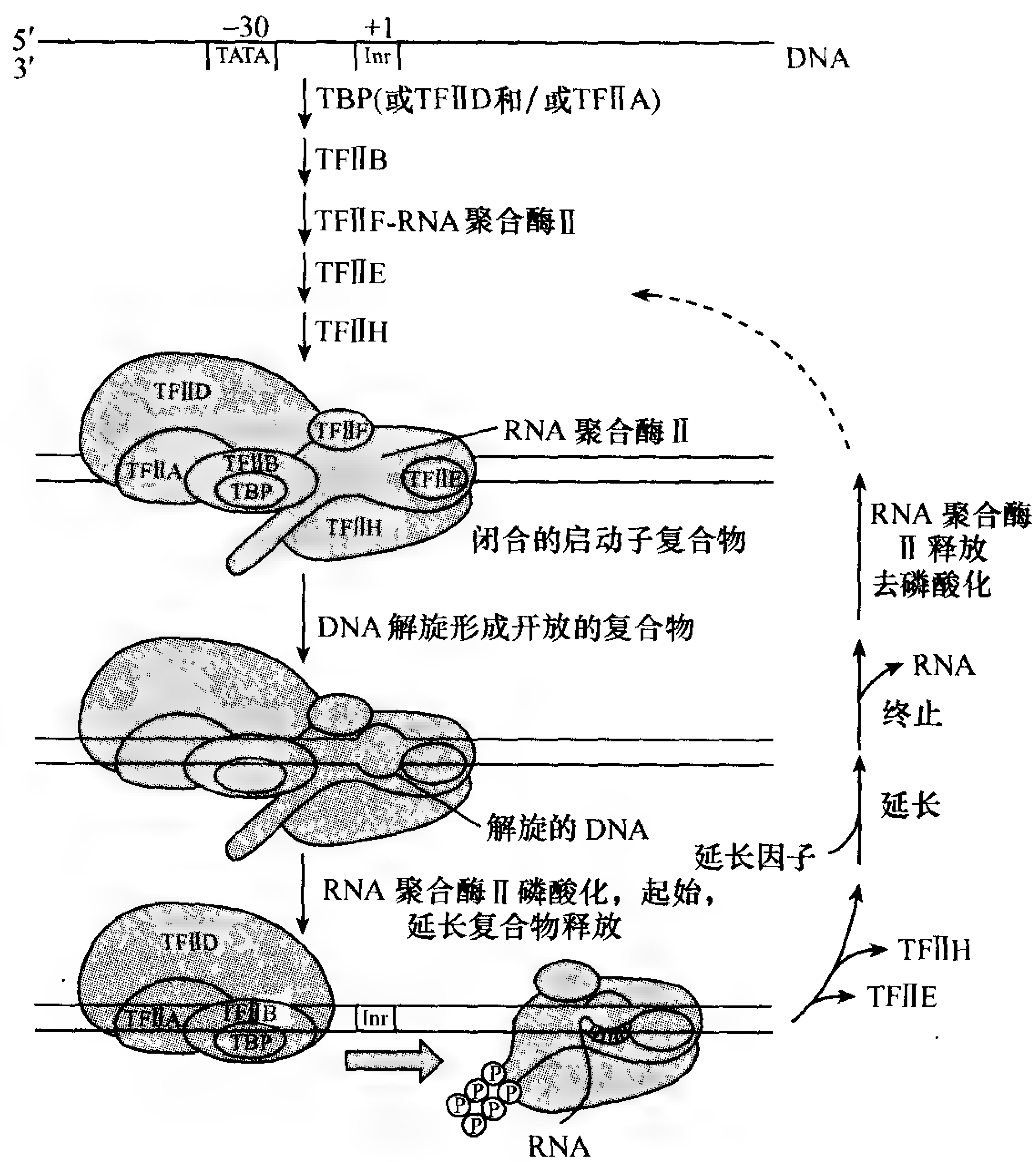
从 1961 年发现了原核生物中的 RNA 聚合酶开始，科学家们已经逐渐推导出了真核生物的转录过程，但一直不清楚转录的具体细节。直到 2001 年美国科学家 R. D. Kornberg 在《科学》杂志上发表了第一张 RNA 聚合酶的全动态晶体图片，才解决了这一难题。Kornberg 小组利用 X 射线和计算机技术测算并描绘出 RNA 聚合酶中各原子的真正位置，构建出了真核生物转录机构整个活动的晶体图片。Kornberg 因此获得 2006 年诺贝尔化学奖。有趣的是，他的父亲 A. Kornberg 找到了 DNA 复制所需的 DNA 聚合酶而获得了 1959 年诺贝尔生理医学奖。

真核生物 RNA 聚合酶的结构比原核生物复杂，所有真核生物的 RNA 聚合酶都有两个不同的大亚基和十几个小亚基。3 种真核生物 RNA 聚合酶都具有核心亚基，与大肠杆菌 RNA 聚合酶的核心亚基有一些序列同源性。最大的亚基（分子质量 160～220kD）和另一大亚基（分子质量 128～150kD）与大肠杆菌 RNA 聚合酶的 β′和 β 相似，相互有联系。RNA 聚合酶Ⅱ由 12 个亚基组成，其最大的亚基称为 RBP1。酵母的 RNA 聚合酶Ⅰ的两个不同的亚基和 RNA 聚合酶Ⅲ的两个不同的亚基，与大肠杆菌 RNA 聚合酶的 α 亚基有一定同源性；酵母的 RNA 聚合酶Ⅱ有两个相同的亚基，与大肠杆菌 RNA 聚合酶的 α 也有一定同源性。除核心亚基外，3 种真核生物 RNA 聚合酶都具有 5 个共同小亚基，其中两个是相同的。另外，每种真核生物 RNA 聚合酶各自还有 5～7 个特有的小亚基。这些小亚基的作用还不清楚，但是，每一种亚基对真核生物 RNA 聚合酶发挥正常功能都是必需的。

RNA 聚合酶Ⅱ最大亚基的羧基末端有一段共有序列（consensus sequence）为 Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser 的重复序列片段，称为羧基末端结构域（carboxyl-terminal domain，CTD）。RNA 聚合酶Ⅰ和 RNA 聚合酶Ⅲ没有 CTD。所有真核生物的 RNA 聚合酶Ⅱ都具有 CTD，只是 7 个氨基酸共有序列的重复程度不同，如酵母 RNA 聚合酶Ⅱ的 CTD 有 27 个重复共有序列，其中 18 个与上述 7 氨基酸共有序列完全一致；哺乳动物 RNA 聚合酶Ⅱ的 CTD 有 52 个重复基序，其中 21 个与上述 7 氨基酸共有序列完全一致。CTD 对于维持细胞的活性是必需的。体外实验显示，去磷酸化的 CTD 在转录起始中发挥作用，当 RNA 聚合酶Ⅱ启动转录离开启动子后，CTD 的许多 Ser 和一些 Tyr 残基被磷酸化。体内实验也证实了这点。

二、转录起始需要启动子、RNA聚合酶和转录因子的参与

RNA聚合酶Ⅱ催化基因转录的过程，可以分为3个期：起始期（RNA聚合酶Ⅱ和通用转录因子形成闭合复合体）、延长期和终止期，起始期和延长期都有相关的蛋白质参与（图11-12）。



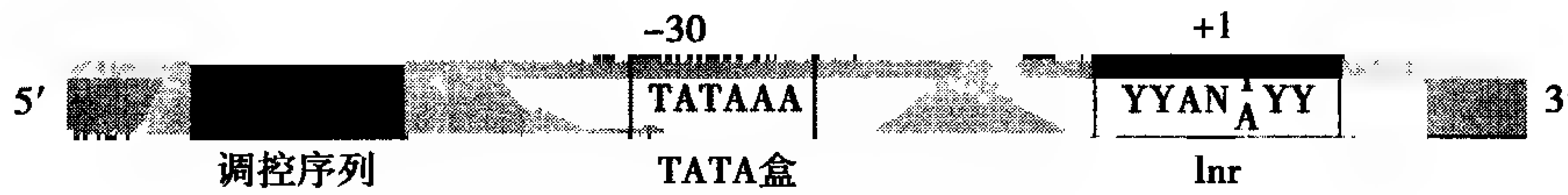
●图11-12　真核RNA聚合酶Ⅱ与通用转录因子的作用过程

真核生物的转录起始上游区段比原核生物多样化。转录起始时，RNA-pol不直接结合模板，其起始过程比原核生物复杂。

（一）转录起始前的上游区段具有启动子核心序列

不同物种、不同细胞或不同的基因，转录起始点上游可以有不同的DNA序列，但这些序列都可统称为顺式作用元件（cis-acting element），一个典型的真核生物基因上游序列示意如图11-13。顺式作用元件包括启动子、启动子上游元件（upstream promoter elements，or promoter-proximal elements）等近端调控元件和增强子（enhancer）等远隔序列。真核生物转录起始也需要RNA聚合酶对起始区上游DNA序列作辨认和结合，生成起始复合物。起始点上游多数有共同的TATA序列，称为Hognest盒或TATA盒（TATA box）。通常认为这就是启动子的核心序列。TATA盒的位置不像原核生物上游－35区和－10区那样典型。某些真核生物基因如管家基因（housekeeping gene）也可以没有TATA盒。许多RNA聚合酶Ⅱ识别的启动子具有保守的共有序列：位于转录起始点附近的起始子（initiator，Inr）（图11-13）。启动子上游元件是位于TATA盒上游的DNA序列，多在转录起始点约－100～－40nt的位置，比较常见的是GC盒和CAAT盒。增强子是能够结合特异基因调节蛋白，促进邻近或远隔特定基因表达的DNA序列。增强子距转

录起始点的距离变化很大，从 100nt 到 50000nt，甚至更大，但总是作用于最近的启动子。在所控基因的上游和下游都可发挥调控作用，但以上游为主。



●图 11-13　真核 RNA 聚合酶Ⅱ识别的启动子共有序列

（二）转录因子

RNA 聚合酶Ⅱ启动转录时，需要一些称为转录因子（transcription factors）的蛋白质，才能形成具有活性的转录复合体。能直接、间接辨认和结合转录上游区段 DNA 的蛋白质，现已发现数百种，统称为反式作用因子（trans-acting factors）。前缀 trans-有“分子外”的意义，指的是它们从 DNA 分子之外影响转录过程。反式作用因子中，直接或间接结合 RNA 聚合酶的，则称为转录因子（transcriptional factors，TF），有时称为通用转录因子（general transcription factor）或基本转录因子（basal transcription factor）。相应于 RNA-pol Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的 TF，分别称为 TFⅠ、TFⅡ、TFⅢ。真核生物的 TFⅡ又分为 TFⅡA，TFⅡB 等，主要的 TFⅡ的功能已清楚，列于表 11-4。所有的 RNA 聚合酶Ⅱ都需要通用转录因子（general transcription factors），这些通用转录因子有 TFⅡA、TFⅡB、TFⅡD、TFⅡE、TFⅡF、TFⅡH，在真核生物进化中高度保守。

表 11-4　参与 RNA-pol Ⅱ转录的 TFⅡ

转录因子	亚基组成和（或）分子量（kDa）	功　能
TFⅡD	TBP* 38	结合 TATA 盒
	TAF**	辅助 TBP-DNA 结合
TFⅡA	12，19，35	稳定 TFⅡD-DNA 复合物
TFⅡB	33	促进 RNA-pol Ⅱ结合及作为其他因子结合的桥梁
TFⅡF	30，74	解螺旋酶
TFⅡE	57（α）34（β）	ATPase
TFⅡH		蛋白激酶活性，使 CTD*** 磷酸化

注：* TBP：TATA binding protein，TATA 结合蛋白
** TAF：TBP associated factors，TBP 辅因子，有多种，在不同的基因转录中由不同的 TAF 辅助
*** CTD：carboxyl terminal domain，RNA-pol Ⅱ大亚基羧基末端结构域

通用转录因子 TFⅡD 不是一种单一蛋白质。它实际上是由 TBP 和 8～10 个 TAFs 组成的复合物。TBP 结合一个 10bp 长度 DNA 片段，刚好覆盖基因的 TATA 盒，而 TFⅡD 则覆盖一个 35bp 或者更长的区域。TBP 的分子量为 20～40kD，而 TFⅡD 复合物的分子量大约为 700kD。TBP 支持基础转录但是不支持诱导等所致的增强转录。而 TFⅡD 中的 TAFs 对诱导引起的增强转录是必要的。有时把 TAFs 叫做辅激活因子（co-activators）。人类细胞中至少有 12 种 TAFs 。可以想象 TFⅡD 复合物中不同 TAFs 与 TBP 的结合可能结合不同启动子，这可以解释这些因子在各种启动子中的选择性活化作用以及对特定启动子存在不同的亲和力。中介子（mediator）也是在反式作用因子和 RNA 聚合酶之间的蛋白质复合体，它与某些反式作用因子相互作用，同时能够促进 TFⅡH 对 RNA 聚合酶羧基端结构域的磷酸化。有时把中介子也归类于辅激活因子。

此外，还有与启动子上游元件如 GC 盒、CAAT 盒等顺式作用元件（cis-acting element）结合的蛋白质，称为上游因子（upstream factors），如 Sp1 结合到 GC 盒上，

C/EBP结合到CAAT盒上。这些反式作用因子调节通用转录因子与TATA盒的结合、RNA聚合酶与启动子的结合及起始复合物的形成，从而协助调节基因的转录效率。

与远隔调控序列如增强子等结合的反式作用因子有很多。可诱导因子（inducible factors）是与增强子等远端调控序列结合的转录因子。它们能结合应答元件，只在某些特殊生理或病理情况下才被诱导产生的，如MyoD在肌肉细胞中高表达，HIF-1在缺氧时高表达。与上游因子不同，可诱导因子只在特定的时间和组织中表达而影响转录。例如，激素以及作为传递胞外信息的其他效应物，通过影响可诱导因子和辅激活因子复合物的组装和活性以及随后在靶基因启动子处转录起始前复合物（pre-initiation complex，PIC）的形成来调节基因的表达。参与的众多组分提供了各种可能的结合方式，从而在某一范围内对某一给定基因的转录活性进行调控。RNA聚合酶Ⅱ与启动子的结合、启动转录需要多种蛋白质因子的协同作用。这通常包括：可诱导因子或上游因子与增强子或启动子上游元件的结合；通用转录因子在启动子处的组装；辅激活因子和（或）中介子在通用转录因子或RNA聚合酶Ⅱ复合物与可诱导因子、上游因子之间的辅助和中介作用。因子和因子之间互相辨认、结合，以准确地控制基因是否转录、何时转录（可参见第十三章）。表11-5列出了Ⅱ型基因中的四类转录因子及其功能。应该指出的是，上游因子和可诱导因子等在广义上也可称为转录因子，但一般不冠以TF的词头而各有自己特殊的名称。

表11-5 Ⅱ型基因中的四类转录因子

转录因子	具体组分	结合序列	功能
基本组分	TBP，TFⅡA，B，E，G，F和H	TBP结合TATA盒	转录起始定位；转录起始和延长
辅激活因子	TAFs和中介子		在可诱导因子和上游因子与基本转录因子、RNA聚合酶结合中起联结和中介作用
上游因子	SP1、ATF、CTF等	启动子上游元件	协助基本转录因子，提高转录效率和专一性
可诱导因子	如MyoD、HIF-1等	增强子等远隔调控序列	时间和空间（组织）特异性地调控转录

（三）转录起始前复合物

真核生物RNA聚合酶不与DNA分子直接结合，而需依靠众多的转录因子。首先是TFⅡD的TBP亚基结合TATA，另一TFⅡD亚基TAF有多种，在不同基因或不同状态转录时，与TBP作不同搭配。在TFⅡA和ⅡB的促进和配合下，形成ⅡD-ⅡA-ⅡB-DNA复合体（图11-12）。

具有转录活性的闭合复合体形成过程中，先由TATA-结合蛋白（TATA-binding protein，TBP）结合启动子的TATA盒，然后TFⅡB与TBP结合，TFⅡB也能与DNA结合。TFⅡA虽然不是必需的，它能稳定已与DNA结合的TFⅡB-TBP复合体，并且在TBP与不具有特征序列的启动子结合时（这种结合比较弱）发挥重要作用。TFⅡB-TBP复合体再与由RNA聚合酶Ⅱ和TFⅡF组成的复合体结合，TFⅡF的作用是通过和RNA聚合酶Ⅱ一起与TFⅡB相互作用，降低RNA聚合酶Ⅱ与DNA的非特异部位的结合，来协助RNA聚合酶Ⅱ靶向结合启动子。最后是TFⅡE和TFⅡH加入，形成闭合复合体，装配完成，这就是转录起始前复合物（pre-initiation complex，PIC）。

TFⅡH具有解旋酶（helicase）活性，能使转录起始点附近的DNA双螺旋解开，使闭合复合体成为开放复合体，启动转录。TFⅡH还具有激酶活性，它的一个亚基能使

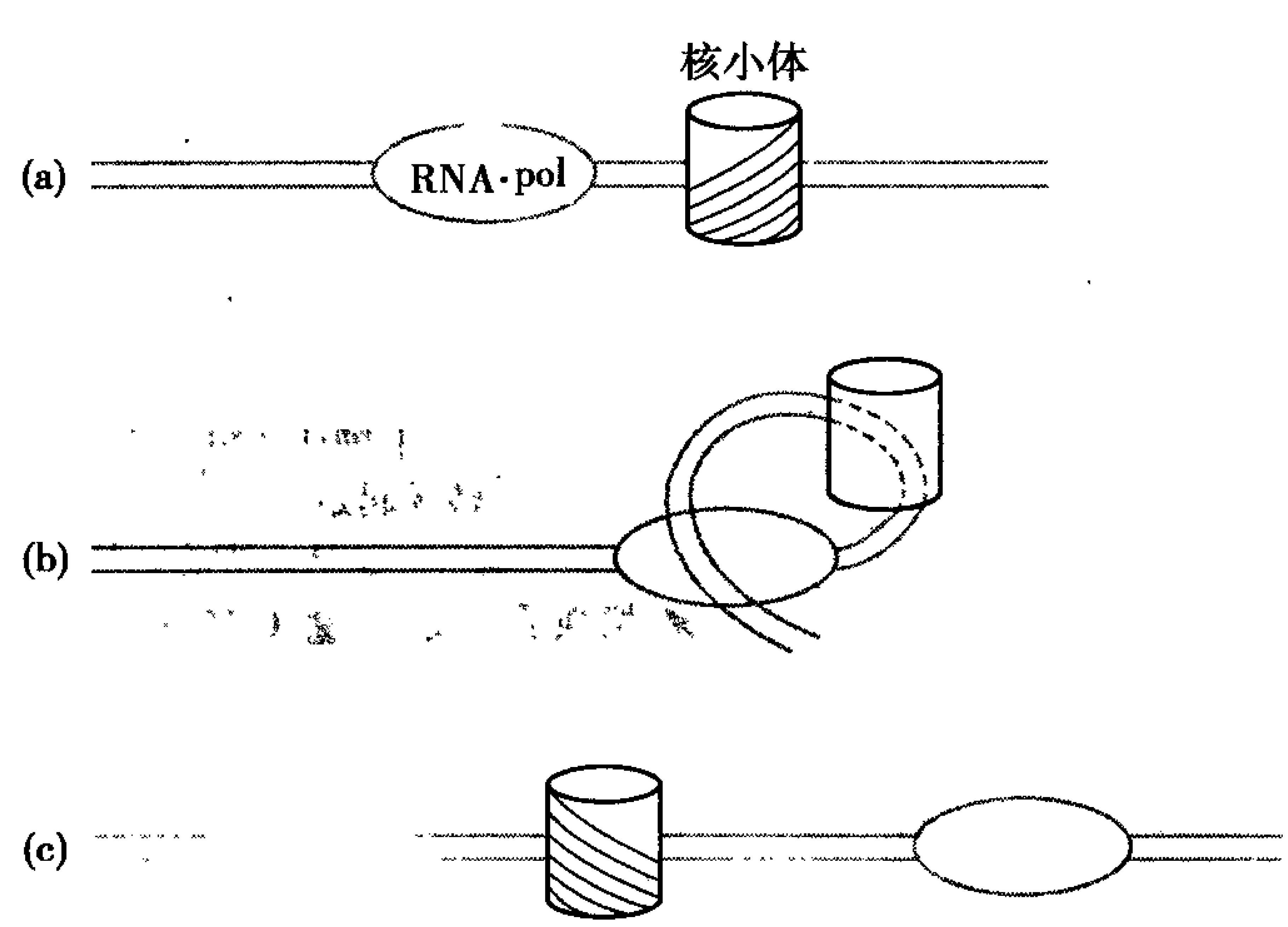
RNA 聚合酶Ⅱ的 CTD 磷酸化。还有一种使 CTD 磷酸化的蛋白质是周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase 9，CDK9)，也是 pTEFb 的组成部分，又对 RNA 聚合酶Ⅱ的活性起调节作用。CTD 磷酸化能使开放复合体的构象发生改变，启动转录。CTD 磷酸化在转录延长期也很重要，而且影响转录后加工过程中转录复合体和参与加工的酶之间的相互作用。当合成一段含有 60～70 个核苷酸的 RNA 时，TFⅡE 和 TFⅡH 释放，RNA 聚合酶Ⅱ进入转录延长期（图 11-12)。此后，大多数的 TF 就会脱离转录起始前复合物。

（四）少数几个反式作用因子的搭配启动特定基因的转录

上述的是典型而有代表性的 RNA 聚合酶Ⅱ催化的转录起始。RNA 聚合酶Ⅰ、Ⅲ的转录起始与此大致相似。不同基因转录特性的研究已广泛开展，并发现数以百计，数量还在不断增加的转录因子。人类基因估计有 2.5 万个，为了保证转录的准确性，不同基因需要不同的转录因子，这是可理解的。转录因子是蛋白质，也需要基因为它们编码。如此延伸下去，2.5 万个基因岂不是不够用？这个问题可用拼板理论来解释：少数几个反式作用因子（主要是可诱导因子和上游因子）之间互相作用，再与基本转录因子、RNA 聚合酶搭配而有针对性地结合、转录相应的基因。可诱导因子和上游因子常常通过辅激活因子或中介子与基本转录因子、RNA 聚合酶结合，但有时可不通过它们而直接与基本转录因子、RNA 聚合酶结合。转录因子的相互辨认结合，恰如儿童玩具七巧板那样，搭配得当就能拼出多种不同的图形。人类基因虽数以万计，但需要的转录因子可能 300 多个就能满足表达不同类型基因的需要。目前不少实验都支持这一理论。用生物信息学估算人类细胞中约有 2000 种编码 DNA 结合蛋白质的基因，约占基因总数的 7%。其中大部分可能是反式作用因子。

三、真核生物转录延长过程中没有转录与翻译同步的现象

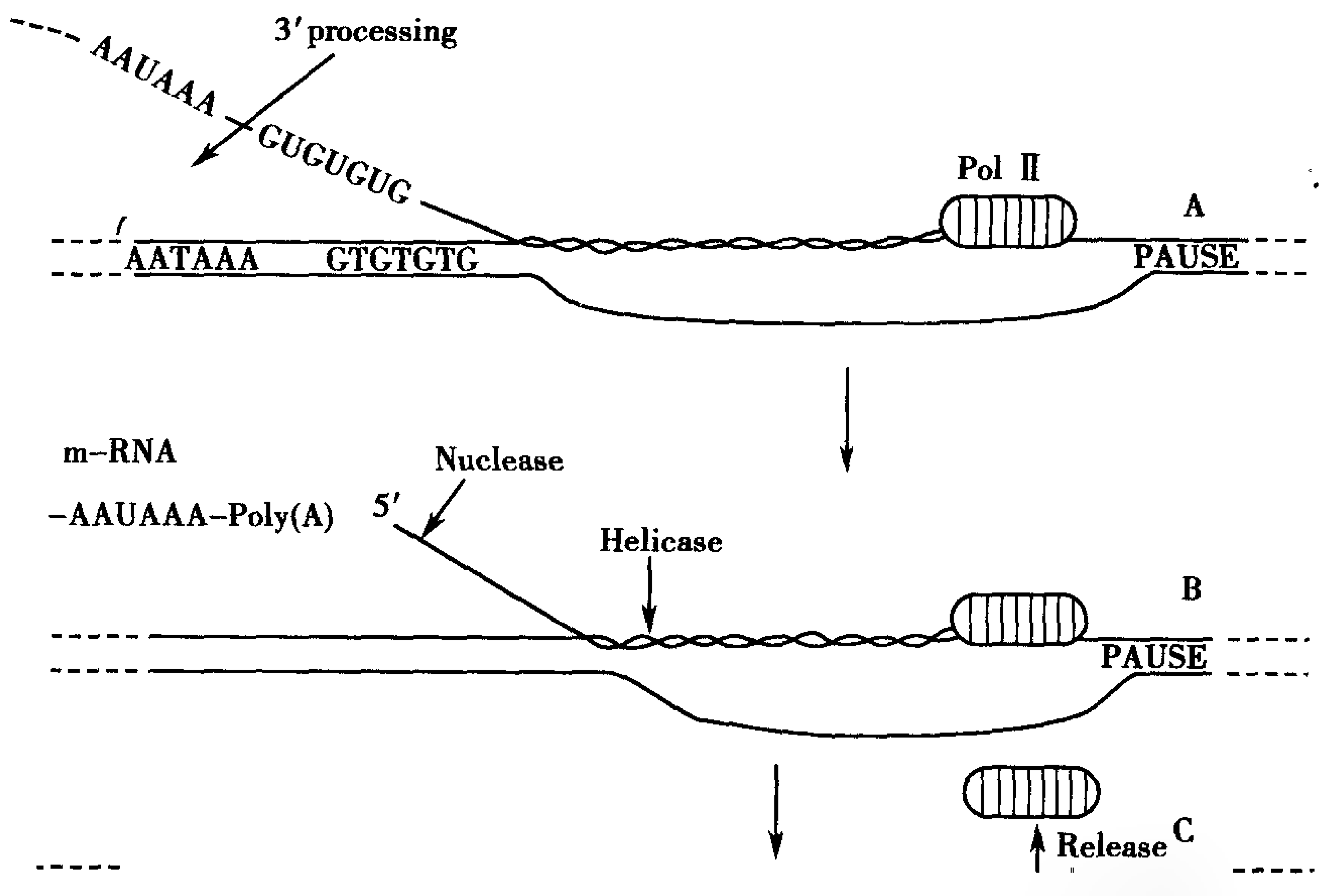
真核生物转录延长过程与原核生物大致相似，但因有核膜相隔，没有转录与翻译同步的现象。真核生物基因组 DNA 在双螺旋结构的基础上，与多种组蛋白组成核小体高级结构。RNA-pol 前移处处都遇上核小体。RNA 聚合酶（500kD，14nm×13nm）和核小体组蛋白八聚体（300kD，6nm×11nm）大小差别不太大。转录延长可以观察到核小体移位和解聚现象。核小体移位仅见于试管内（*in vitro*）转录实验。用含核小体结构的 DNA 片段作模板，具备酶、底物及合适反应条件下进行转录。转录中以 DNA 酶水解法监测，从 DNA 电泳图像观察，能保持约 200bp 及其倍数的阶梯形电泳条带。据此认为，核小体只是发生了移位（图 11-14）。但在培养细胞（*in vivo*）的转录实验中观察到，组蛋白中含量丰富的精氨酸发生了乙酰化。DNA 分子上又出现 AMP→ADP→聚 ADP 的现象。前者降低正电荷，后者减少负电荷。核小体组蛋白-DNA 是靠碱性氨基酸提供正电荷和核苷酸磷酸根上的负电荷来维系的。据此推论：核小体在转录过程可能发生解聚。



● 图 11-14　真核生物转录延长中的核小体移位
(a) RNA-pol 前移将遇到核小体；(b) 原来绕在组蛋白上的 DNA 解聚及弯曲；(c) 一个区段转录毕，核小体移了位

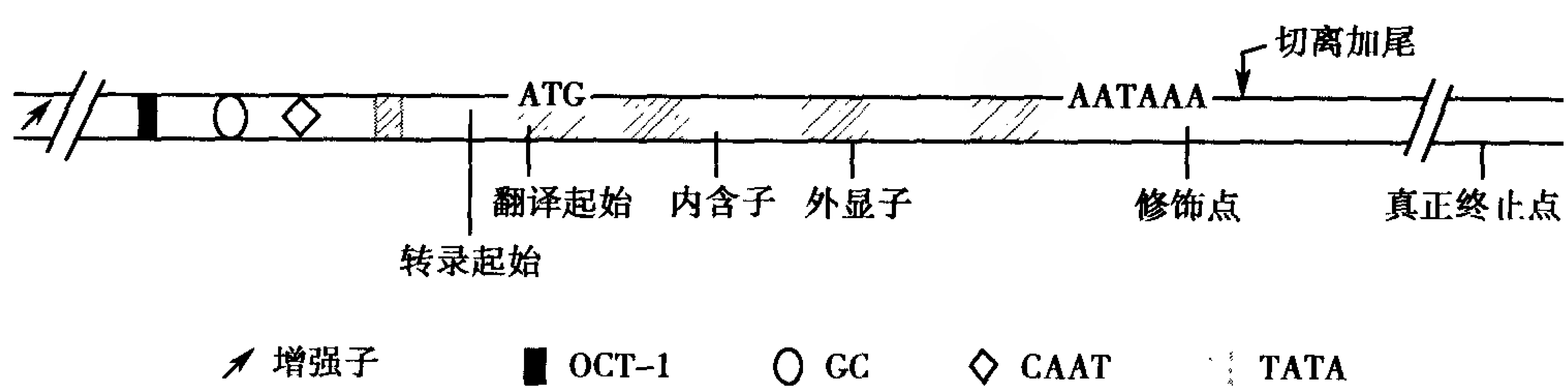
四、真核生物的转录终止和加尾修饰同时进行

真核生物的转录终止，是和转录后修饰密切相关的。真核生物 mRNA 有聚腺苷酸（poly A）尾巴结构，是转录后才加进去的，因为在模板链上没有相应的聚胸苷酸（poly dT）。转录不是在 poly A 的位置上终止，而是超出数百个乃至上千个核苷酸后才停止。已发现在读码框架的下游，常有一组共同序列 AATAAA，再下游还有相当多的 GT 序列。这些序列称为转录终止的修饰点（图 11-15）。



●图 11-15 真核生物的转录终止及加尾修饰

转录越过修饰点后，mRNA 在修饰点处被切断，随即加入 poly A 尾及 5′-帽子结构。下游的 RNA 虽继续转录，但很快被 RNA 酶降解。因此有理由相信，帽子结构是保护 RNA 免受降解的。因为修饰点以后的转录产物无帽子结构。图 11-16 是一个常见的真核基因的结构。注意转录起始点至翻译起始点之间是一段 5′非编码区。



●图 11-16 真核生物 RNA 聚合酶Ⅱ转录的基因及其转录起始上游序列

RNA 聚合酶缺乏有校读（proofreading）功能的 3′→5′核酸外切酶活性，因此转录发生的错误率比复制发生的错误率高，大约是十万分之一到万分之一。因为对大多数基因而言，一个基因可以转录产生许多 RNA 拷贝，而且 RNA 是最终被降解和替代的，所以转录产生错误 RNA 对细胞的影响远比复制产生错误 DNA 对细胞的影响小。

第四节　真核生物 RNA 的加工

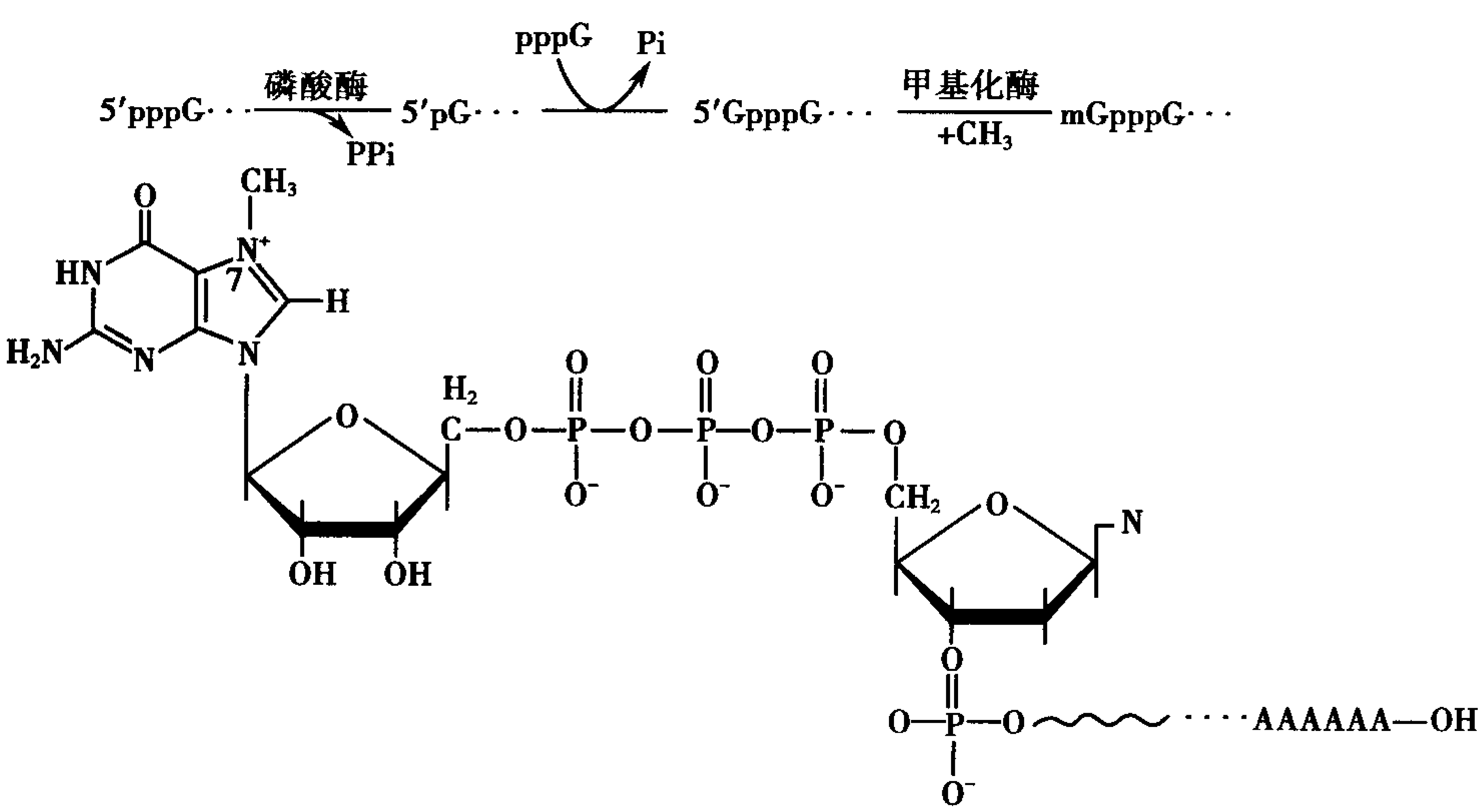
真核生物转录生成的 RNA 分子是初级 RNA 转录物（primary RNA transcript），几乎所有的初级 RNA 转录物都要经过加工，才能成为具有功能的成熟的 RNA。加工主要在细胞核中进行。

一、真核生物 mRNA 的加工包括首、尾修饰和剪接

真核生物 mRNA 转录后，需要进行 5′-末端和 3′-末端（首、尾部）的修饰以及对 mRNA 进行剪接（splicing），才能成为成熟的 mRNA，被转运到核糖体，指导蛋白质翻译。

（一）前体 mRNA 在 5′-末端加入"帽"结构

前体 mRNA（precursor mRNA）也称为初级 mRNA 转录物（primary mRNA transcript），或非均一核 RNA（heterogeneous nuclear RNA，hnRNA）。大多数真核 mRNA 的 5′-末端有 7-甲基鸟嘌呤的帽结构。RNA 聚合酶Ⅱ催化合成新生 RNA 长度达 25～30 个核苷酸时，其 5′-末端的核苷酸就与 7-甲基鸟嘌呤核苷通过不常见的 5′，5′-三磷酸连接键相连（图 11-17）。这个真核 mRNA 加工过程的起始步骤由两种酶，加帽酶（capping enzyme）和甲基转移酶（methyltransferase）催化完成。加帽酶有两个亚基，在加帽结构的过程中，此酶与 RNA 聚合酶Ⅱ的 CTD 结合在一起，一个亚基的作用是去除新生 RNA 的 5′端核苷酸的 γ-磷酸；另一个亚基的作用是将一个 GTP 分子中的 GMP 部分和新生 RNA 的 5′端结合，形成 5′，5′-三磷酸结构；然后由 S-腺苷甲硫氨酸先后提供甲基，使加上去的 GMP 中鸟嘌呤的 N_7 和原新生 RNA 的 5′端核苷酸的核糖 2′-O 甲基化，这两步甲基化反应由不同的甲基转移酶催化（图 11-17）。5′帽结构可以使 mRNA 免遭核酸酶的攻击，也能与帽结合蛋白质复合体（cap-binding complex of protein）结合，并参与 mRNA 和核糖体的结合，启动蛋白质的生物合成。

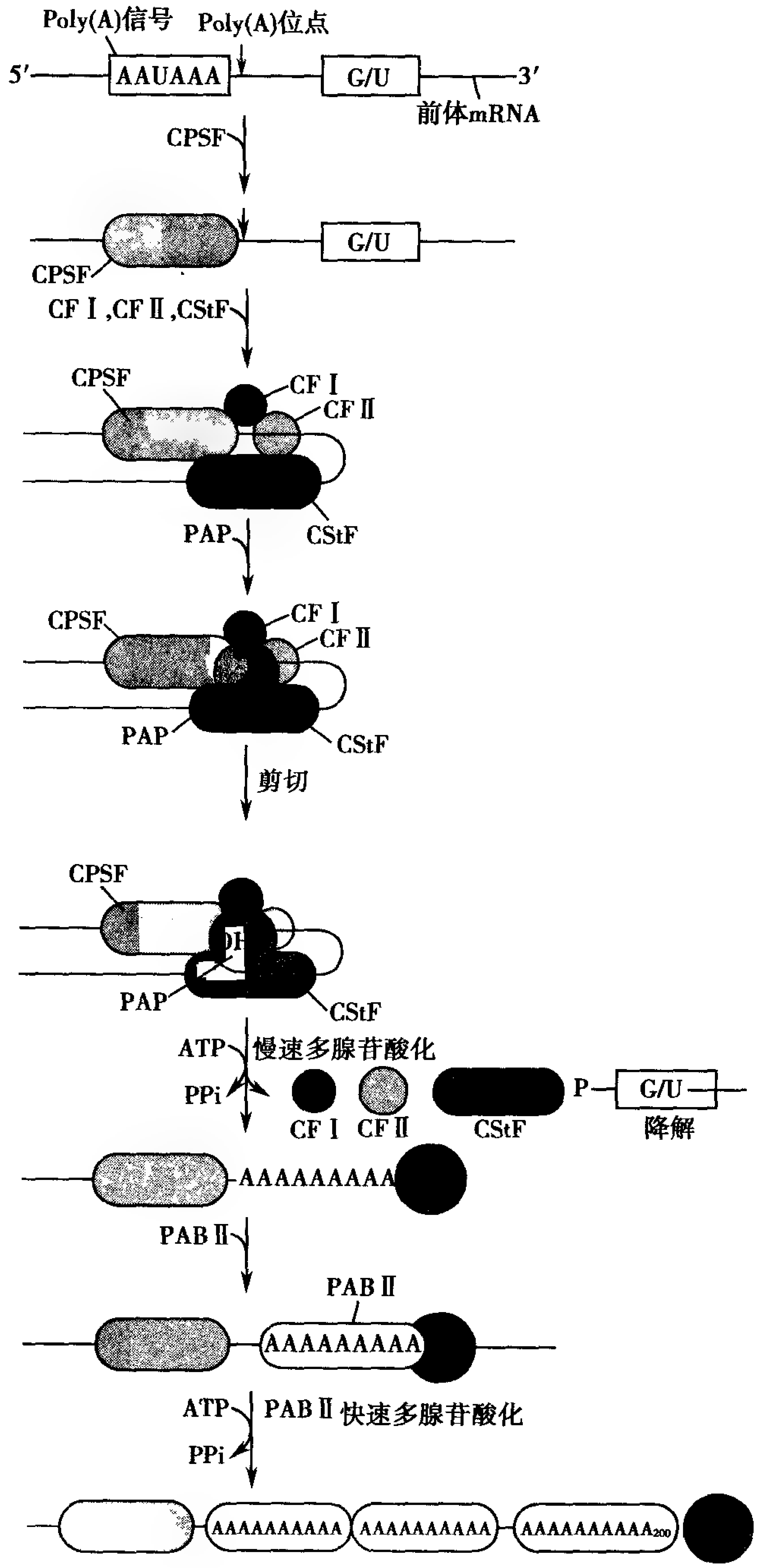


● 图 11-17　真核 mRNA 的 5′帽结构及形成过程

式中示第一个 G N-7 位甲基化（称为帽 0）甲基化也可以发生在 5′端两个 G 之间的核糖上，或在第二位（通常也是 G）碱基上（帽 1）；或多个位点上甲基化（帽 3）

（二）前体 mRNA 在 3′端特异位点断裂并加上多聚腺苷酸尾

真核 mRNA，除了组蛋白的 mRNA，在 3′端都有多聚腺苷酸［poly（A）］尾结构，约含 80～250 个腺苷酸。大多数已研究过的基因中，都没有 3′端相应的多聚胸苷酸序列，说明 poly（A）尾的出现是不依赖于 DNA 模板的。转录最初生成的 mRNA 3′末端长于成熟的 mRNA。因此认为，加入 poly（A）之前，先由核酸外切酶切去前体 mRNA 3′末端的一些核苷酸，然后加入 poly（A）。前体 mRNA 上的断裂点也是聚腺苷酸化（polyadenylation）的起始点，断裂点的上游 10～30nt 有 AAUAAA 信号序列，断裂点的下游 20～40nt 有富含 G 和 U 的序列，前者是特异序列，后者是非特异序列。在 hnRNA 上也发现 poly A 尾巴，推测这一过程也应在核内完成，而且先于 mRNA 中段的剪接。尾部修饰是和转录终止同时进行的过程。



●图 11-18　真核 mRNA 3′多聚腺苷酸化过程

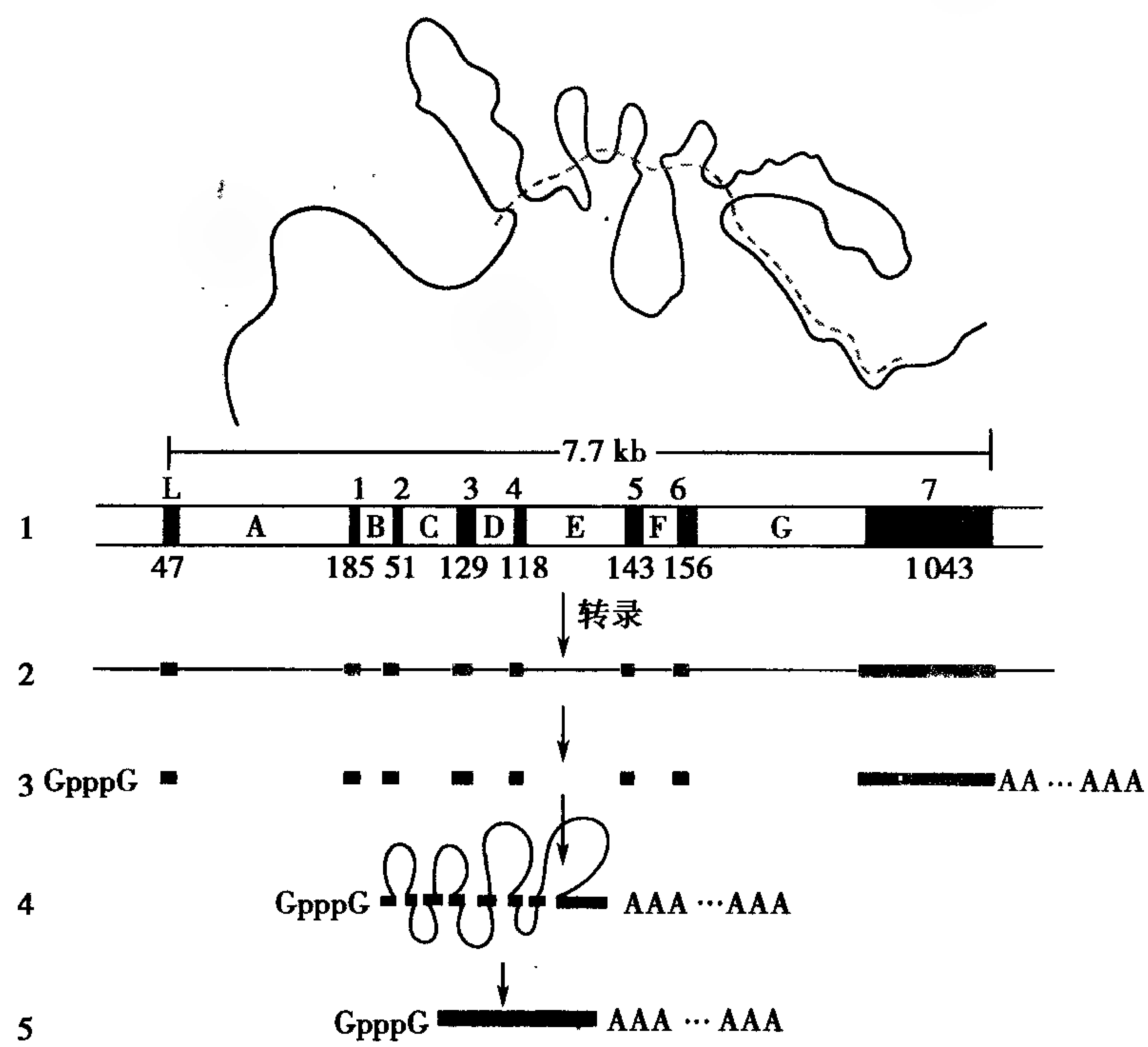
poly A 的长度很难确定，因其长度随 mRNA 的寿命而缩短，而且都经过提取阶段才进行测定，能否准确从数量反映体内情况是个问题。随着 poly A 缩短，翻译的活性下降。因此推测，poly A 的有无与长短，是维持 mRNA 作为翻译模板的活性以及增加 mRNA 本身稳定性的因素。一般真核生物在胞质内出现的 mRNA，其 poly A 长度为 100～200 个核苷酸之间，也有少数例外，如组蛋白基因的转录产物，无论是初级的或成熟的，都没有 poly A 尾巴。

前体 mRNA 分子的断裂和加多聚腺苷酸尾是多步骤过程（图 11-18）。断裂和聚腺苷酸化特异性因子（cleavage and polyadenylation specificity factor，CPSF，由 4 条不同的多肽组成，分子质量为 360kD）先与 AAUAAA 信号序列形成不稳定的复合体，然后至少有 3 种蛋白质——断裂激动因子（cleavage stimulatory factor，CStF）、断裂因子Ⅰ（cleavage factor Ⅰ，CF Ⅰ）、断裂因子Ⅱ（CF Ⅱ）与 CPSF-RNA 复合体结合。CStF 与断裂点的下游富含 G 和 U 的序列相互作用能使形成的多蛋白复合体稳定。最后在前体 mRNA 分子断裂之前，多聚腺苷酸聚合酶［poly（A）polymerase，PAP］加入到多蛋白复合体，前体 mRNA 在断裂点断裂后，立即在断裂产生的游离 3′-OH 进行多聚腺苷酸化。在加入大约前 12 个腺苷酸时，速度较慢，随后快速加入腺苷酸，完成多聚腺苷酸化。多聚腺苷酸化的快速期有一种多聚

腺苷酸结合蛋白Ⅱ［poly（A）binding protein Ⅱ，PABⅡ，与细胞质里的腺苷酸结合蛋白-PAB不同］参与，PABⅡ和慢速期合成多聚腺苷酸结合，促进多聚腺苷酸聚合酶合成多聚腺苷酸的速度。PABⅡ的另一个功能是：当多聚腺苷酸尾结构达足够长时，使多聚腺苷酸聚合酶停止作用。

（三）前体 mRNA 的剪接主要是去除内含子

1. hnRNA 和断裂基因　核内出现的转录初级产物，分子量往往比在胞质内出现的成熟 mRNA 大几倍，甚至数十倍，核内的初级 mRNA 称为杂化核 RNA（hetero-nuclear RNA，hnRNA）。核酸序列分析证明，mRNA 来自 hnRNA，不过去掉了相当大部分的中间片段。核酸杂交试验又证明，hnRNA 和 DNA 模板链可以完全配对；成熟的 mRNA 与模板链 DNA 杂交，出现部分的配对双链区域和中间相当多鼓泡状突出的单链区段。根据上述实验结果（图 11-19，上），20 世纪 70 年代末提出了基因断裂性的概念：真核生物结构基因，由若干个编码区和非编码区互相间隔开但又连续镶嵌而成，去除非编码区再连接后，可翻译出由连续氨基酸组成的完整蛋白质，这些基因称为断裂基因（split gene）。



●图 11-19　断裂基因及其转录、转录后修饰

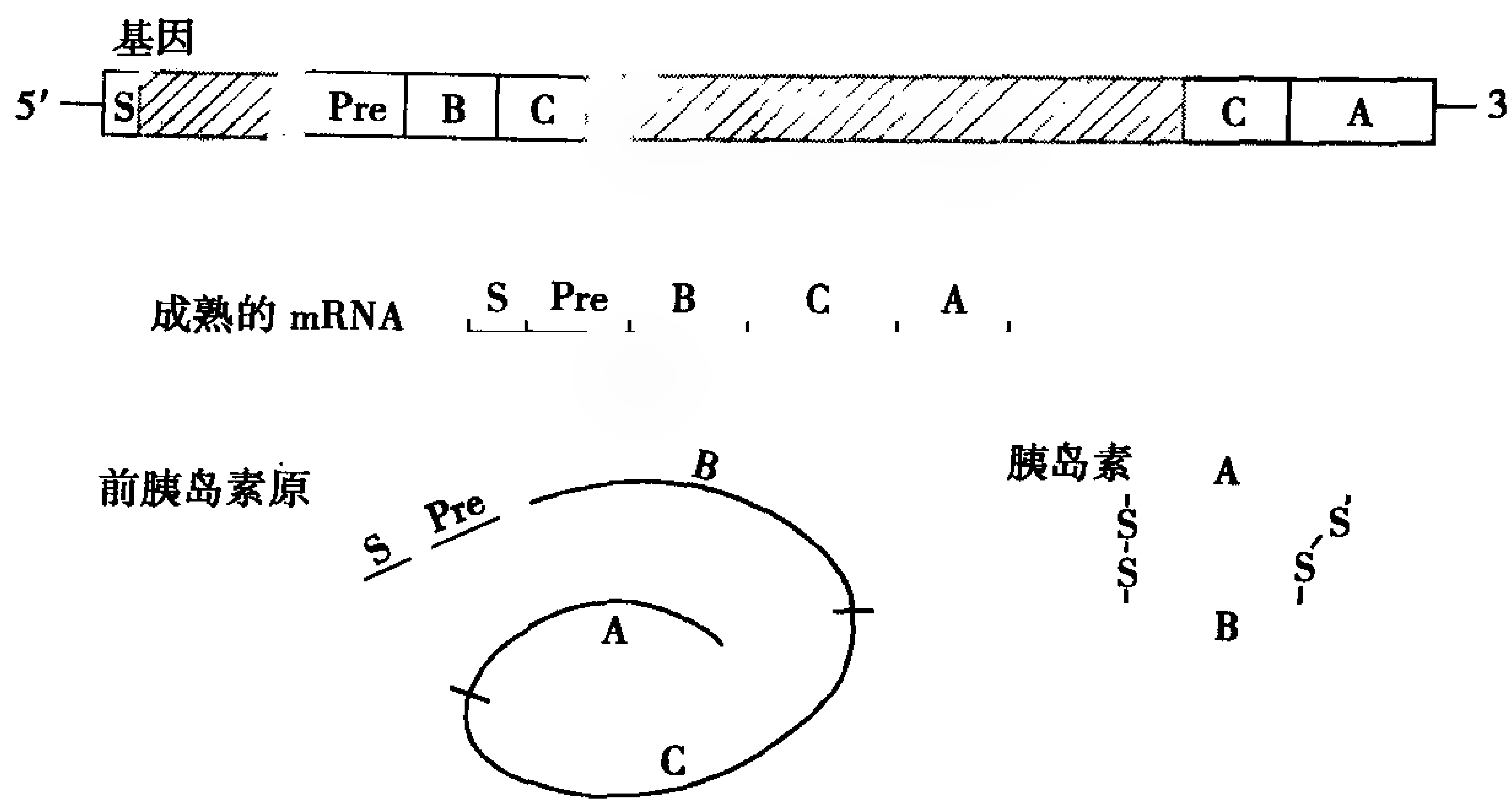
1. 卵清蛋白基因　2. 转录初级产物 hnRNA　3. hnRNA 的首、尾修饰　4. 剪接过程中套索 RNA 的形成　5. 胞浆中出现的 mRNA，套索已去除图上方为成熟 mRNA 与基因 DNA 杂交的电镜所见，虚线代表 mRNA，实线为 DNA 模板

2. 外显子（exon）**和内含子**（intron）　这两个词分别代表基因的编码和非编码序列。因 tRNA 和 rRNA 成熟过程也需剪接，外显子应定义为：在断裂基因及其初级转录产物上出现，并表达为成熟 RNA 的核酸序列。内含子是隔断基因的线性表达而在剪接过程中被除去的核酸序列。绝大多数脊椎动物的蛋白质编码基因含有内含子。只有为数不多的基因，如组蛋白基因没有内含子。有些低等真核生物的蛋白质编码基因也缺乏内含子。例如，酿酒酵母的许多基因就没有内含子。第一个被详细研究的断裂基因是鸡的卵清蛋白基因，其全长为 7.7kb（图 11-19）。该基因有 8 个外显子和 7 个内含子；图中黑色并用数字

表示外显子，包括 L 是前导序列。用字母表示的白色部分是内含子。成熟的 mRNA 为 386 个氨基酸编码。hnRNA 是和相应的基因等长的，即内含子也存在于初级转录产物中。图的最上方为成熟的 mRNA 与 DNA 模板链的电镜杂交所见，虚线代表 mRNA，实线为 DNA 模板链。

最庞大的一个人类基因是抗肌萎缩蛋白（distrophin）基因，全长数百万核酸对（10^6bp），由 50 多个外显子和相应 50 多个内含子相隔，成熟的 mRNA 有万余个核苷酸。

从广义上说，蛋白质翻译后加工（第十二章）也纳入内含子的概念。胰岛素这种简单的蛋白质，由两个内含子把编码序列隔开。C 肽是胰岛素原才有的，转变成有活性的胰岛素时，C 肽被水解掉。C 肽的基因也是被内含子隔断的（图 11-20）。因此广义上，C 基因也是内含子，称为翻译后删除内含子。



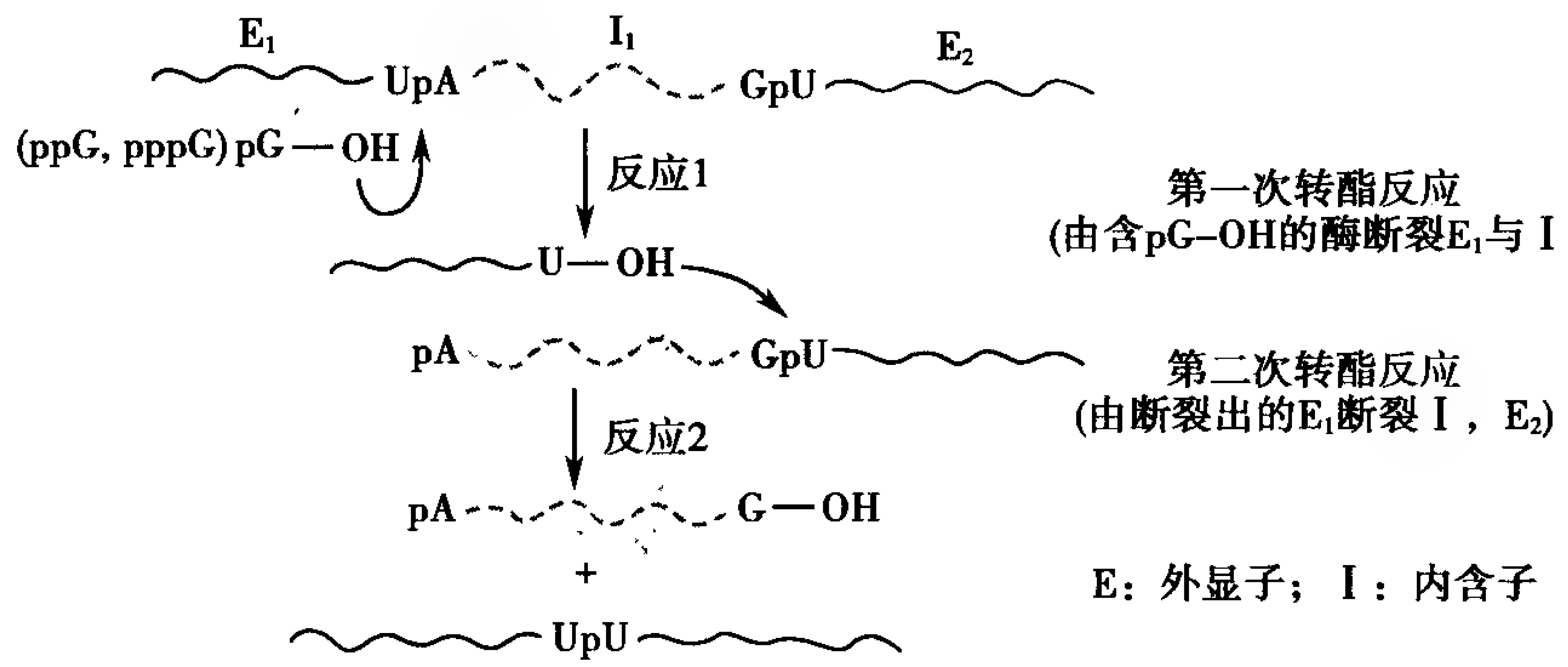
● 图 11-20　胰岛素的基因、转录和翻译产物

斜线示内含子；S：信号肽；A，B：胰岛素的亚基；C：C 肽；Pre：前导序列

关于内含子的功能，有两种不同看法。一种见解认为：内含子是在进化中出现或消失的，内含子如果有功能，只不过是有利于物种的进化选择。例如细菌丢失了内含子，可以使染色体变小和复制速度加快。真核生物保留内含子，则可以产生外显子移动，有利于真核生物在适应环境改变时能合成功能不同而结构上只有微小差异的蛋白质。另一些学者则力图证明内含子在基因表达中有调控功能。例如：现在已知道某些遗传性疾病，其变异是发生在内含子而不在外显子。有些内含子在调控基因表达的过程中起作用，有些内含子还能为酶编码。

3. mRNA 的剪接（mRNA splicing）　去除初级转录产物上的内含子，把外显子连接为成熟的 RNA，称为剪接。根据电镜所见（图 11-19），内含子区段弯曲，使相邻的两个外显子互相靠近而利于剪接，称为套索 RNA（lariat RNA）。这是最初提出的剪接模式。此后，还发现内含子近 3′端的嘌呤甲基化，例如 3^mG 是形成套索必需的。从初级转录产物一级结构分析及 snRNA 特性的研究，目前对剪接已有较深了解。大多数内含子都以 GU 为 5′端的起始，而其末端则为 AG-OH-3′。5′GU……AG-OH-3′称为剪接接口（splicing junction）或边界序列。剪接后，GU 或 AG 不一定被剪除。剪接过程的化学反应称为二次转酯反应（twice transesterification）(图 11-21)。

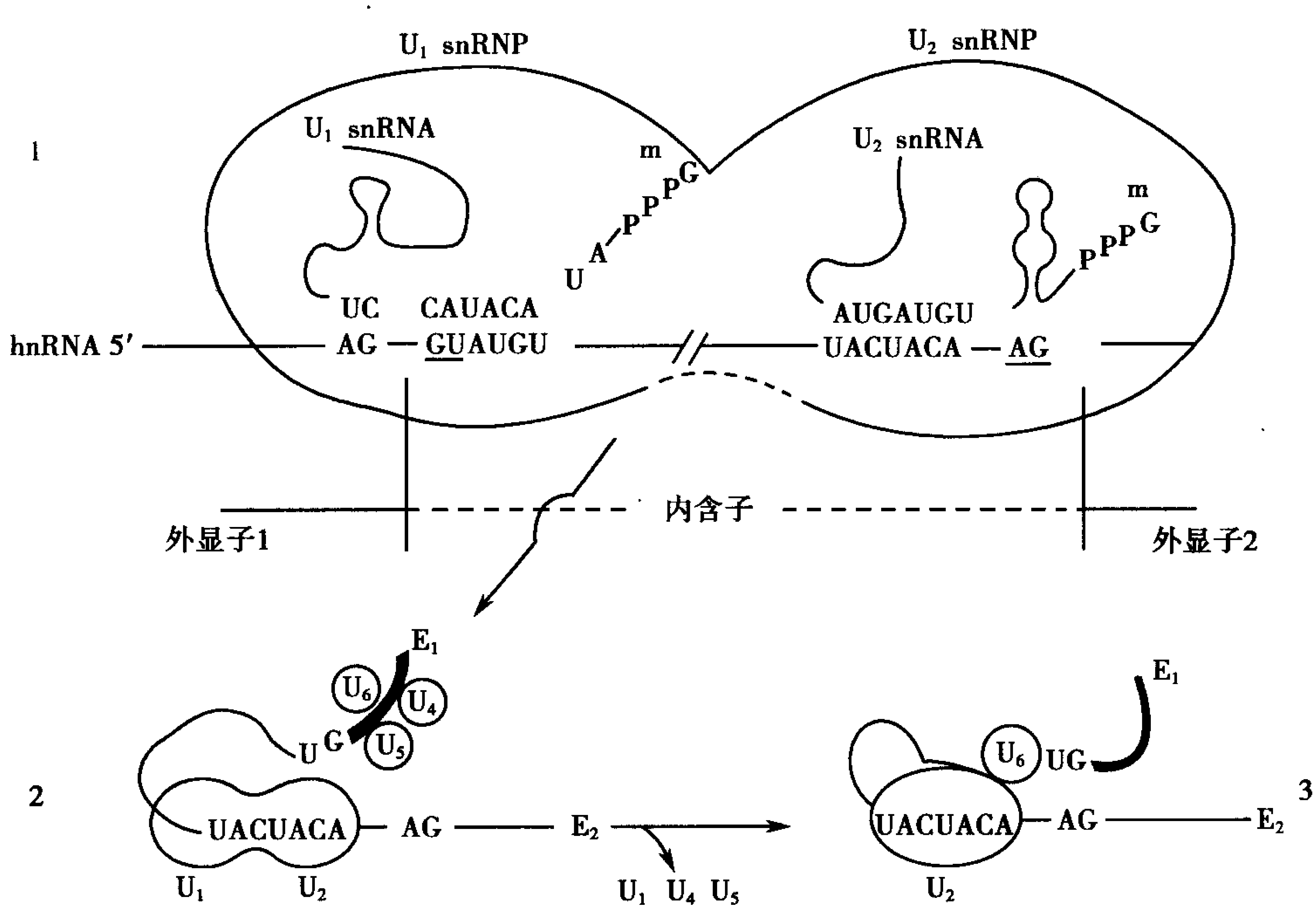
外显子 E_1 和 E_2 之间的内含子 I_1 因与剪接体结合而弯曲，5′端与 3′端互相靠近。内含子可因小部分碱基与外显子互补而互相依附。第一次转酯反应需要细胞核内的含鸟苷酸 pG、ppG 或 pppG 的辅酶，以 3′-OH 基对 E_1/I 之间的磷酸二酯键作亲电子攻击，使 E_1/I 之间的共价键断开。pG 则取代 E_1 成为 5′端，E_1 的 3′-OH 游离出，所以称为转酯反应。第二次转酯反应由 E_1 的 3′-OH 对 I/E_2 之间的磷酸二酯键作亲电子攻击，使 I 与 E_2 断开，



●图 11-21　剪接过程的二次转酯反应
箭头示由核糖的 3′-OH 对磷酸二酯键的亲电子攻击

由 E_1 取代了 I。这样，两个外显子相连起来而内含子则被切除掉。在这两步反应中磷酸酯键的数目并没有改变，因此也没有能量的消耗。

mRNA 前体剪接的场所发生在剪接体（spliceosome），因此这类内含子称为剪接体内含子。剪接体由小分子核糖核蛋白（small nuclear ribonucleoprotein，简称 snRNP，是一种特异的 RNA-蛋白质复合体，常读作 snurp）组成。它与 hnRNA 结合，使内含子形成套索并拉近上、下游外显子。每一种 snRNP 含有一种核小 RNA（small nuclear RNA，snRNA），snRNA 有 5 种：U_1、U_2、U_4、U_5 和 U_6，长度范围在 100～300 个核苷酸，分子中碱基以尿嘧啶含量最丰富，因而以 U 作分类命名。真核生物从酵母到人类，snRNP 中的 RNA 和蛋白质都高度保守。剪接体是一种超大分子（supramolecule）复合体，主要由上述 5 种 snRNA 和大约 50 种蛋白质装配而成，剪接体装配需要 ATP 提供能量。剪接体其生成和作用如下（图 11-22）：



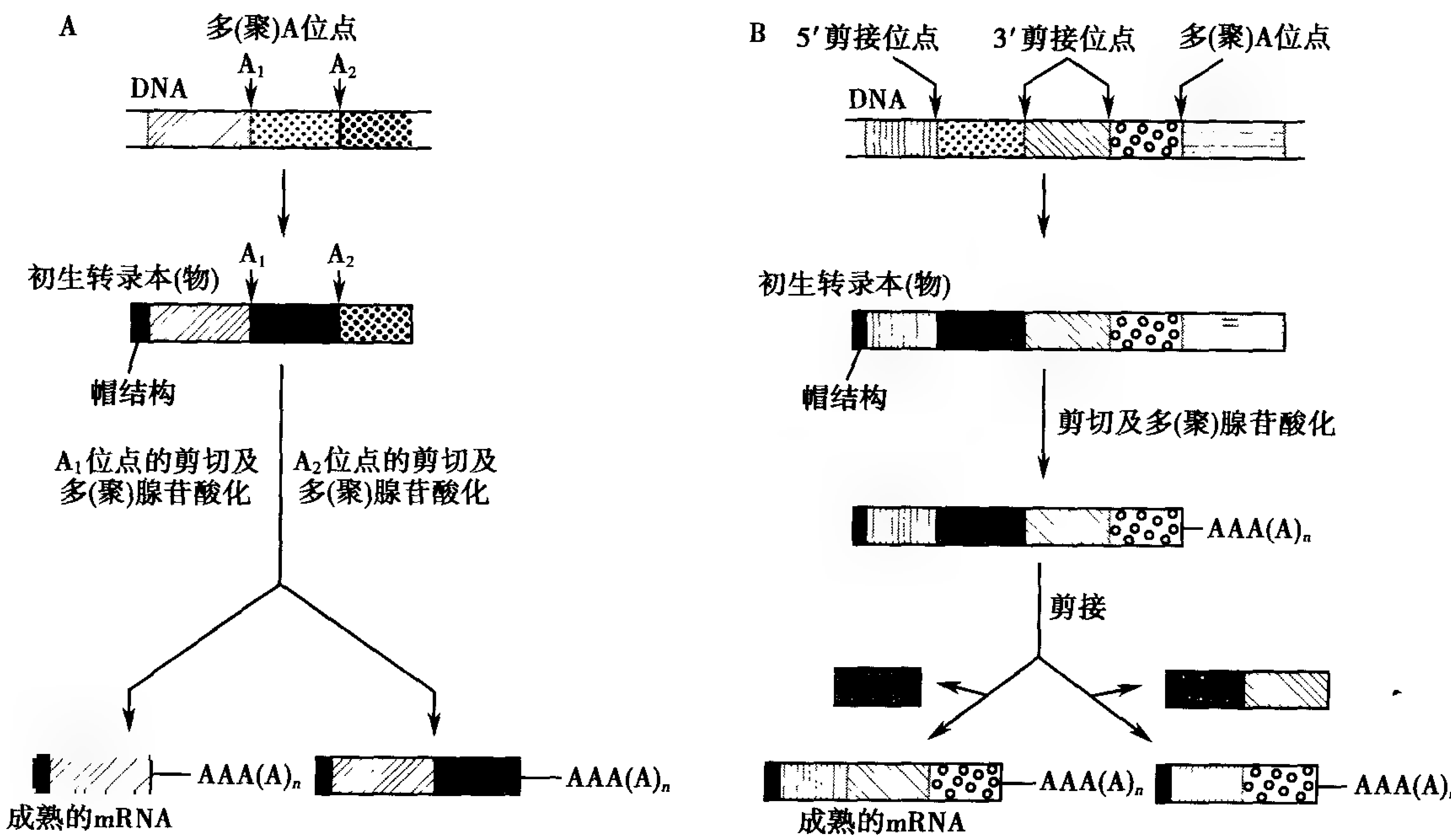
●图 11-22　snRNP 与 hnRNA 结合成为剪接体
1. snRNA 与边界序列有配对关系，利于剪接体生成；2. U_4、U_5、U_6 加入形成完整剪接体，内含子形成套索；3. U_2、U_6 形成催化中心

1）内含子5'-和3'-端的边界序列分别与U_1、U_2的snRNA配对，使snRNP结合在内含子的两端；

2）U_4、U_5和U_6加入，形成完整的剪接体。此时内含子发生弯曲成套索状。上、下游的外显子E_1和E_2靠近；

3）结构调整，释放U_1、U_4和U_5。U_2和U_6形成催化中心，发生转酯反应。

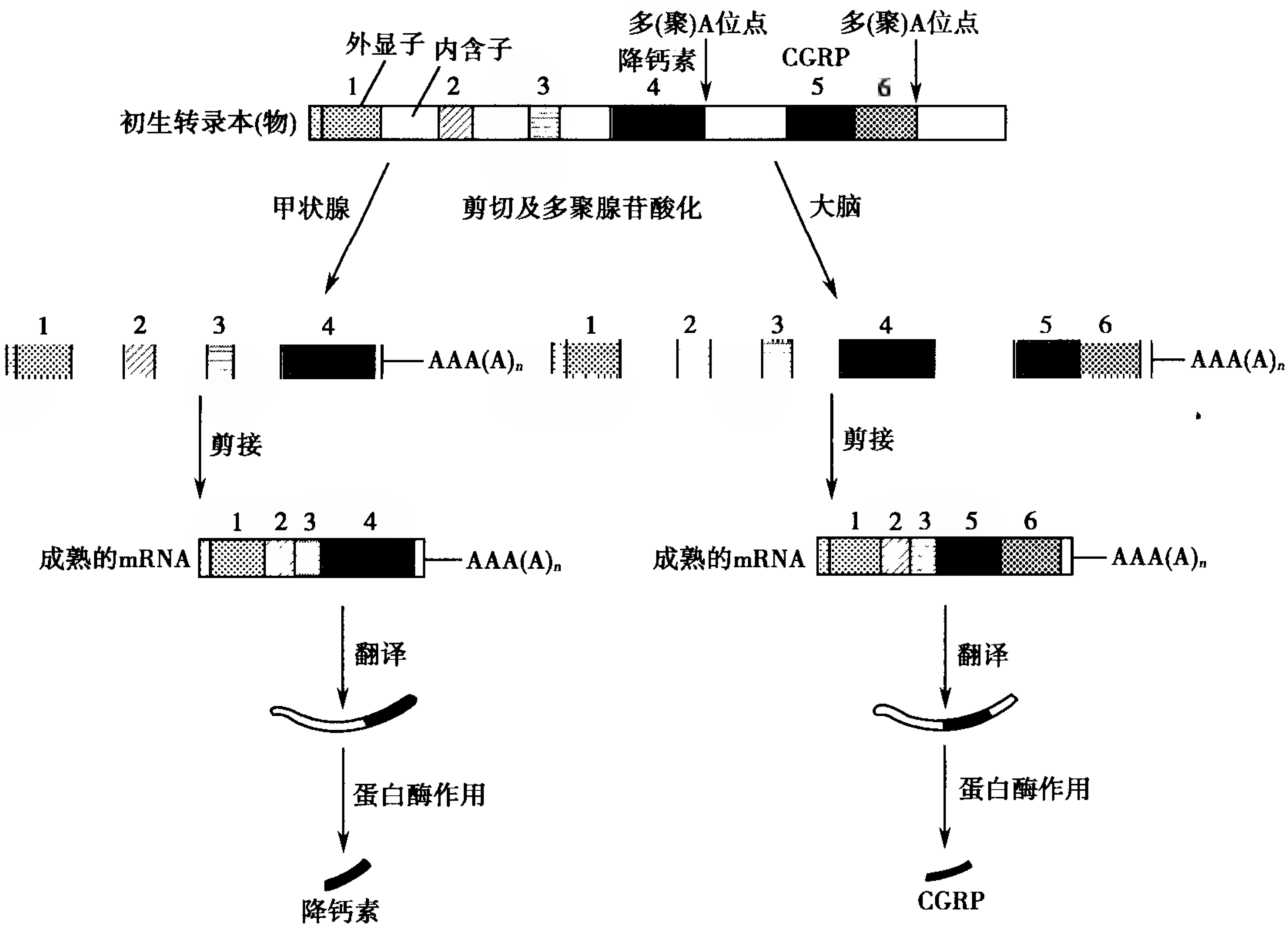
4. 真核生物前体mRNA分子经剪切（cleavage）**和剪接**（splicing）**两种模式可加工成不同的mRNA** 真核生物前体mRNA分子的加工除剪接（splicing）外，还有一种剪切（cleavage）模式。剪切就是剪去某些内含子，然后在上游的外显子3'端直接进行多聚腺苷酸化，不进行相邻外显子之间的连接反应；剪接是指剪切后又将相邻的外显子片段连接起来，然后进行多聚腺苷酸化。大多数真核生物前体mRNA分子经过加工只能产生一种成熟的mRNA，翻译成相应的一种多肽。有些真核生物前体mRNA能经过剪切或（和）剪接加工成不同的mRNA。也就是说，这些真核生物前体mRNA分子的加工具有一个以上加多聚腺苷酸的断裂和多聚腺苷酸化的位点，而采取剪切（cleavage）模式（图11-23A）或（和）采取选择性剪接（alternative splicing）模式（图11-23B）。例如，免疫球蛋白重链基因的前体mRNA分子有几个加多聚腺苷酸的断裂和多聚腺苷酸化的位点，通过多聚腺苷酸位点选择机制，产生免疫球蛋白重链的多样性，是通过剪切模式；果蝇发育过程中的不同阶段会产生3种不同形式的肌球蛋白重链，这是由于同一肌球蛋白重链的前体mRNA分子通过选择性剪接机制，产生3种不同形式的mRNA。同一种前体mRNA分子在大鼠甲状腺产生降钙素（calcitonin），而在大鼠脑产生降钙素-基因相关肽（calcitonin-gene related peptide），是由于两种机制都参与了加工过程（图11-24）。



●图11-23 真核细胞基因的前体mRNA交替加工的两种机制

（四）mRNA编辑（mRNA editing）是对基因的编码序列进行转录后加工

有些基因的蛋白质产物的氨基酸序列与基因初级转录物的序列并不完全对应，mRNA上的一些序列是经过编辑（editing）过程发生改变的。例如人类基因组上只有一个载脂蛋



CGRP：降钙素基因相关蛋白

●图 11-24　大鼠降钙素基因转录本的选择性加工

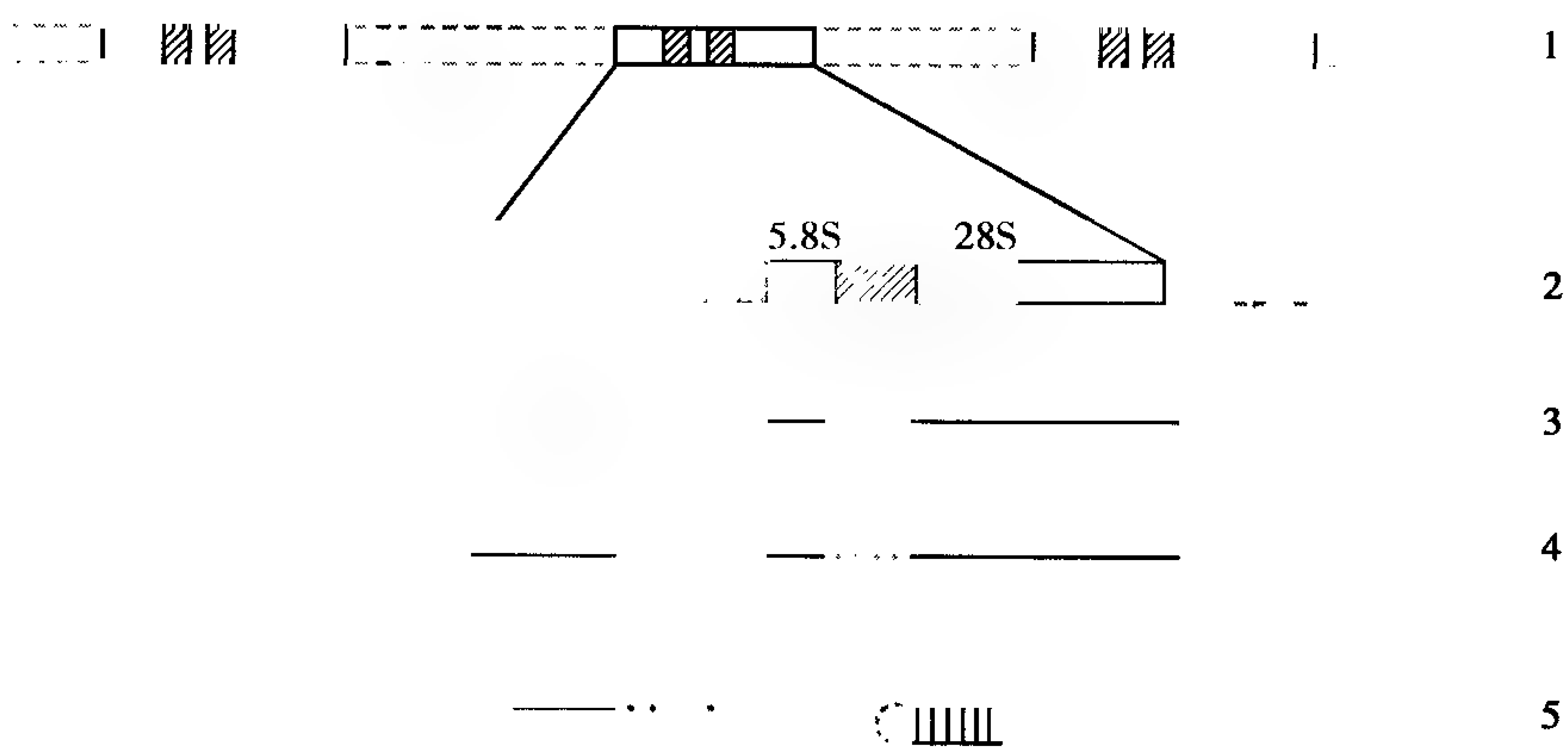
白 B（apolipoprotein B，apoB）基因，转录后也发生 RNA 编辑，编码产生的载脂蛋白 B 有两种形式，一种是 $apoB_{100}$（分子质量 513kD），由肝细胞合成；另一种是 $apoB_{48}$（分子质量 250kD）由小肠黏膜细胞合成。这两种 apoB 都是由 $apoB_{100}$ 基因产生的 mRNA 编码的，有一种胞嘧啶核苷脱氨酶（cytosine deaminase），只在肠黏膜细胞中发现，它能与 $apoB_{100}$ 基因产生的 mRNA 的编码第 2153 位氨基酸的密码子（CAA 编码 Gln）结合，使其中的 C 转变为 U，从而使原来 CAA 转变成终止密码 UAA，因此 $apoB_{48}$ 实际上是 $apoB_{100}$ 氨基端那部分的肽链（图 11-25）。又例如：脑细胞谷氨酸受体（GluR）是一种重要的离子通道。GluR-mRNA 发生脱氨基使 A 转变为 G，导致一个关键位点上的谷氨酰胺密码子 CAG 变为 CGG（Arg），含精氨酸的 GluR 不能通过 Ca^{2+}。这样，不同功能的脑细胞就可以选择地产生不同的受体。人类基因组计划执行中曾估计人类基因总数在 5 万～10 万甚至 10 万以上。至 2001 年测序完成后，认为人类只有约 25000～35000 个基因。RNA 编辑作用说明，基因的编码序列经过转录后加工，是可有多用途分化的，因此也称为分化加工（differential RNA processing）。

人肝细胞 ($apoB_{100}$)	5'---	C A A	C U G	C A G	A C A	U A U	A U G	A U A	C A A	U U U	G A U	C A G	U A U —3'
		— Gln	— Leu	— Gln	— Thr	— Tyr	— Met	— Ile	— Gln	— Phe	— Asp	— Gln	— Tyr —
人肠上皮细胞 ($apoB_{48}$)	---	C A A	C U G	C A G	A C A	U A U	A U G	A U A	U A A	U U U	G A U	C A G	U A U
		— Gln	— Leu	— Gln	— Thr	— Tyr	— Met	— Ile	— Stop				
氨基酸残基数		2146		2148		2150		2152		2154		2156	

●图 11-25　在肝细胞、小肠黏膜细胞进行的 $apoB_{100}$ 基因的 mRNA 编码不同

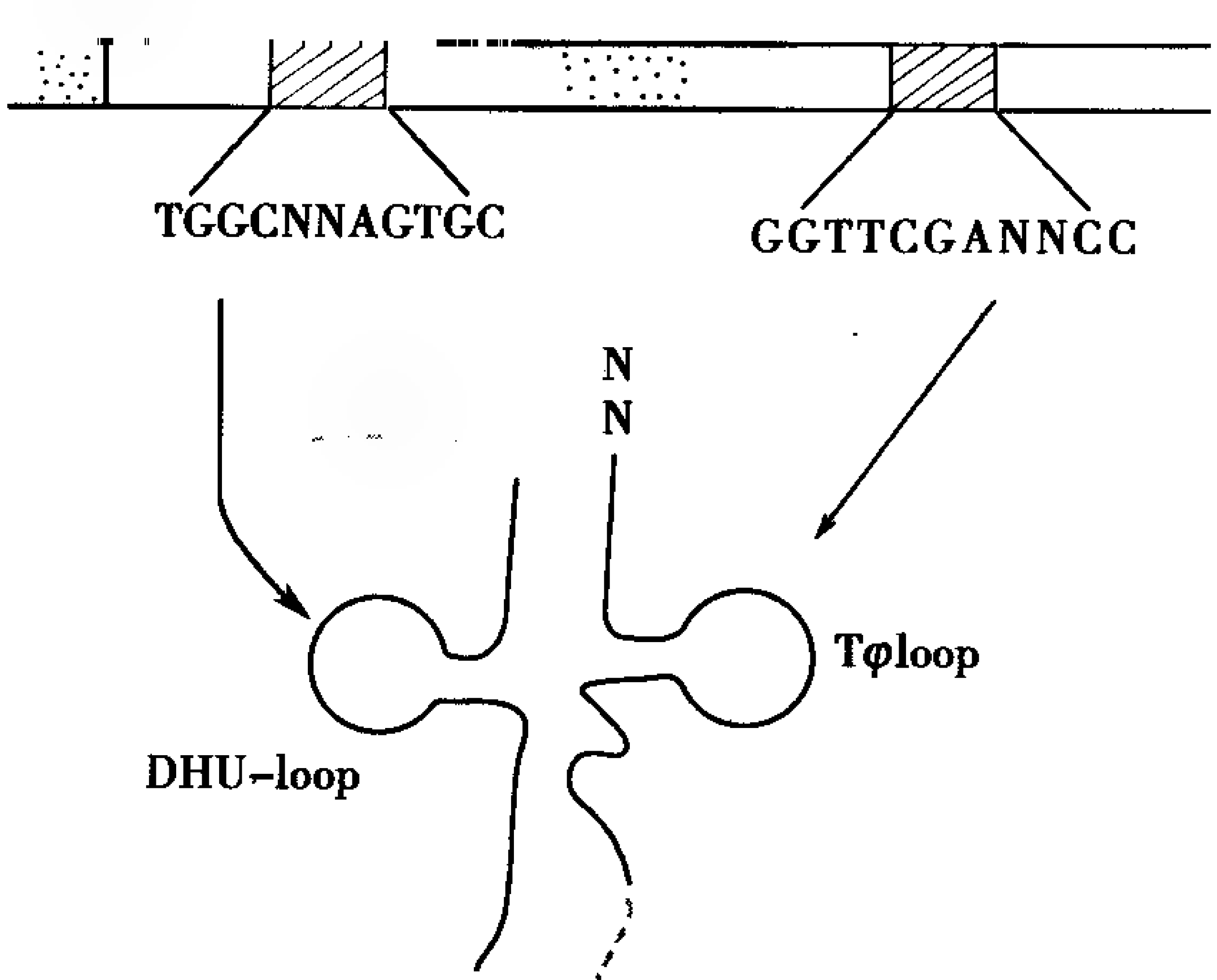
二、真核前体 rRNA 的加工

真核细胞的 rRNA 基因（rDNA）属于丰富基因（redundant gene）族的 DNA 序列，即染色体上一些相似或完全一样的纵列串联基因（tandem gene）单位的重复。属于丰富基因族的还有 5SrRNA 基因、组蛋白基因、免疫球蛋白基因等等。不同物种基因组可有数百或上千个 rDNA，每个基因又被不能转录的基因间隔（gene spacer）分段隔开。可转录片段为 7～13kb，间隔区也有若干 kb 大小。注意基因间隔不是内含子（图 11-26）。rDNA 位于核仁内，每个基因各自为一个转录单位。



●图 11-26　rRNA 转录后加工
1，2. rDNA，斜线为内含子，虚线是基因间隔；
3. 45S 转录产物；4. 剪接；5. 终产物

真核生物核内都可发现一种 45S 的转录产物，它是三种 rRNA 的前身。45S rRNA 经剪接后，分出属于核糖体小亚基的 18S rRNA。余下的部分再剪接成 5.8S 及 28S 的 rRNA。rRNA 成熟后，就在核仁上装配，与核糖体蛋白质一起形成核糖体，输出胞质。生长中的细胞，rRNA 较稳定；静止状态的细胞，rRNA 的寿命较短。

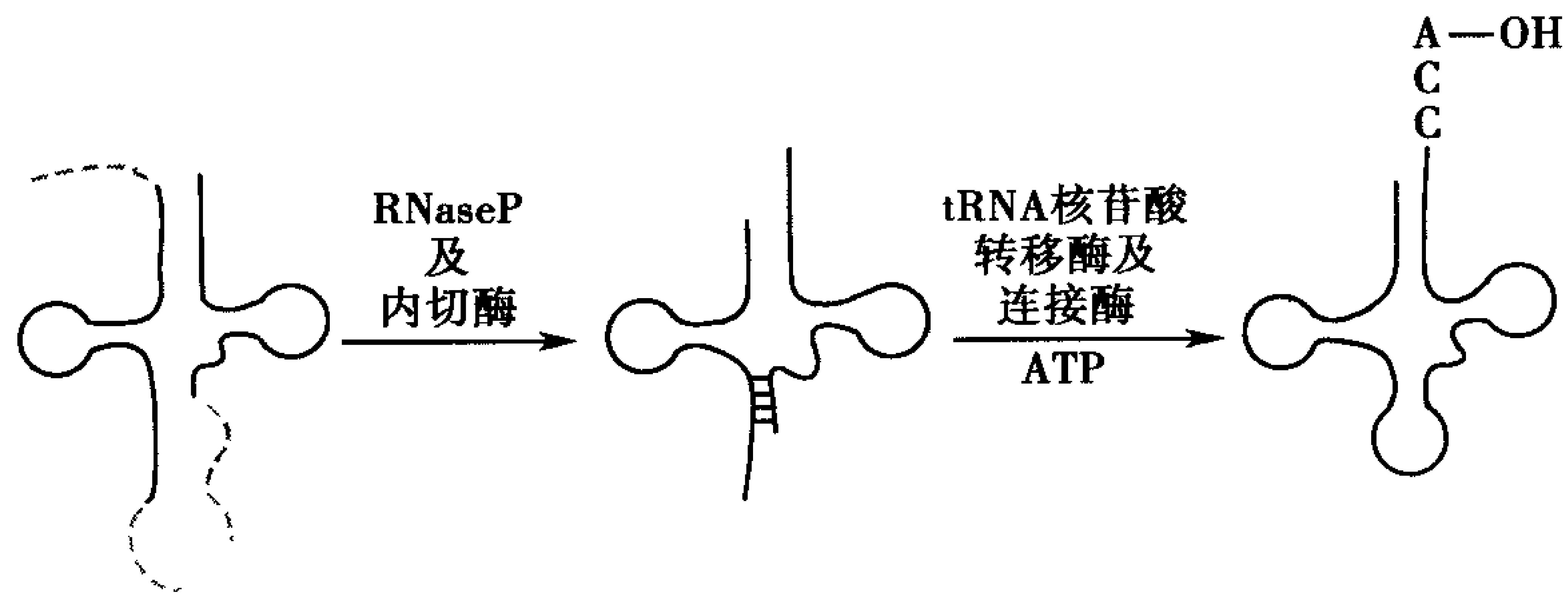


●图 11-27　RNA pol Ⅲ转录的基因及其转录初级产物
虚线是转录后加工要被剪除的部分 3′的 CAA-OH 也是加工生成的

三、真核生物前体 tRNA 的加工包括把核苷酸的碱基修饰为稀有碱基

真核生物的大多数细胞有 40～50 种不同的 tRNA 分子。真核生物有较多编码 tRNA 的基因，而且是多拷贝。以酵母前体 tRNA-Tyr 分子的加工为例。在酵母前体 tRNA-Tyr 分子中，5′端为 16 个核苷酸的前导序列，中部为 14 个核苷酸的内含子，3′端还有 2 个尿嘧啶核苷酸。前体 tRNA 分子加工为成熟的 tRNA 有 4 方面变化（图 11-27）。①5′端的 16 个核苷酸序列由 RNase P 切除；②3′端的两个核苷酸由 RNase D 切除，再由核苷酸转移酶加上 CCA；③柄-环结构的一些核苷酸的碱基经

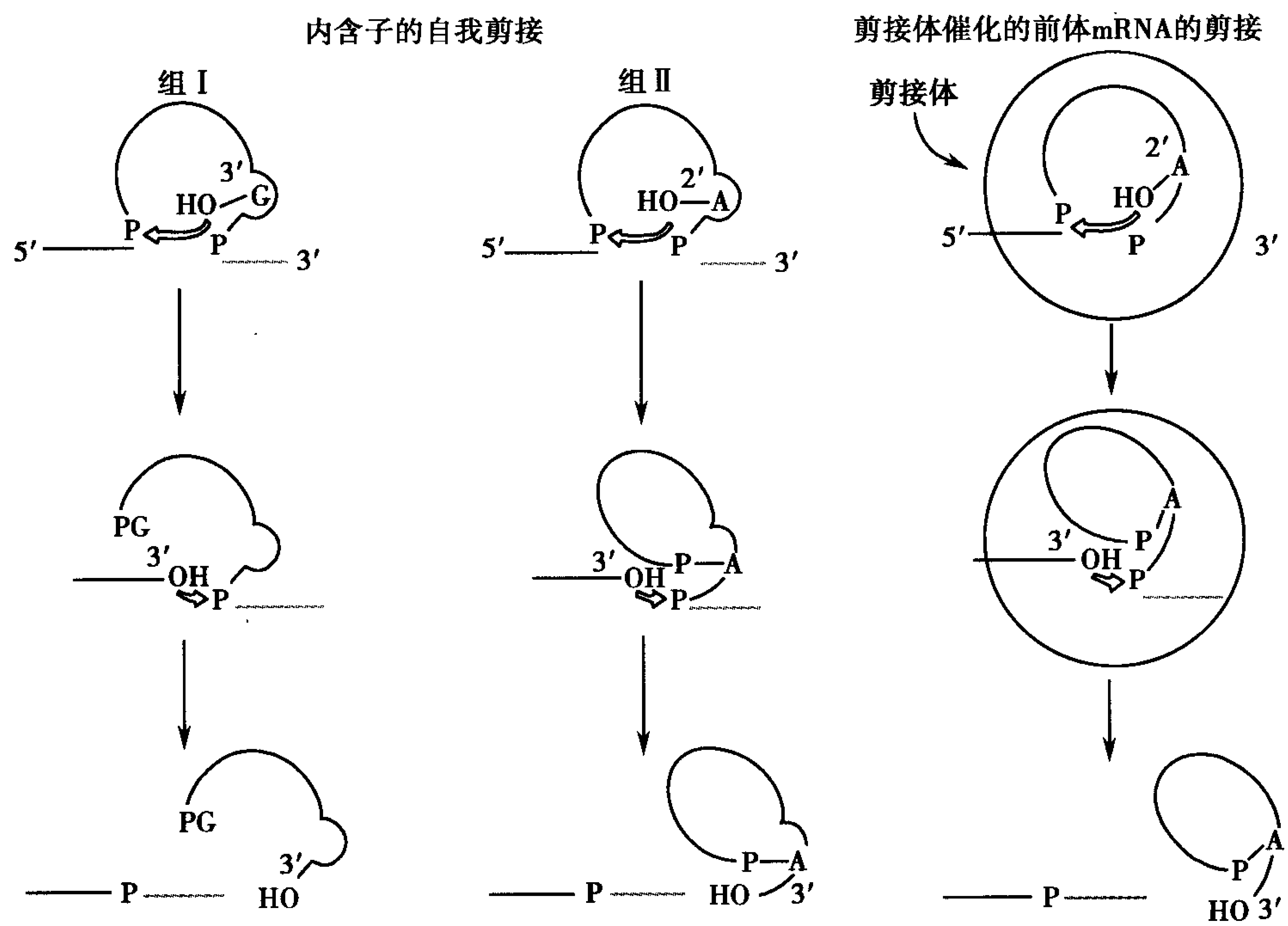
化学修饰为稀有碱基，包括某些嘌呤甲基化生成甲基嘌呤、某些尿嘧啶还原为二氢尿嘧啶（DHU）、尿嘧啶核苷转变为假尿嘧啶核苷（φ）、某些腺苷酸脱氨成为次黄嘌呤核苷酸（I）；④通过剪接切除内含子。剪接机制有与前体 mRNA 分子的剪接体剪接和前体 rRNA 分子自身剪接相同与不同的机制，后一种催化剪接的是蛋白质，而不是 RNA，前体 tRNA 分子必须折叠成特殊的二级结构，剪接反应才能发生，内含子一般都位于前体 tRNA 分子的反密码子环（图 11-28）。



●图 11-28　tRNA 的剪接是酶促反应，切除内含子的核酸内切酶由 tRNA 基因内含子编码

四、RNA 催化一些真核和原核基因内含子的自剪接

1982 年美国科学家 T. Cech 和他的同事发现四膜虫（Tetrahymena thermophilic）编码 rRNA 前体的 DNA 序列含有间隔内含子序列，他们在体外用从细菌纯化得到的 RNA 聚合酶转录从四膜虫纯化的编码 rRNA 前体的 DNA，结果是在没有任何来自四膜虫的蛋白质情况下，rRNA 前体能准确地剪接去除内含子。这种由 RNA 分子催化自身内含子剪



●图 11-29　组Ⅰ、组Ⅱ内含子的剪切

接的反应称为自剪接（self-splicing）。随后在其他单细胞生物体、线粒体、叶绿体的rRNA前体，一些噬菌体的mRNA前体及细菌tRNA前体也发现有这类自身剪接的内含子，并称之为组Ⅰ内含子（group Ⅰ intron）。组Ⅰ内含子以鸟嘌呤核苷或鸟嘌呤核苷酸作为辅因子（cofactor），这种辅因子是游离的，并不是组Ⅰ内含子RNA链的组成部分，而且也不是能量分子。鸟嘌呤核苷或鸟嘌呤核苷酸的3′-羟基与内含子的5′磷酸参与转酯化反应，这种转酯反应与前面介绍的前体mRNA内含子剪接的转酯化反应类似，不过后者参与反应的是分支点A的2′-OH，切除的内含子是线状，而不是"套索"状。某些线粒体和叶绿体的mRNA前体和tRNA前体具有另一类自身剪接的内含子，称为组Ⅱ内含子（group Ⅱ intron），这类内含子的剪接与前面介绍的前体mRNA内含子剪接相同，但是没有剪接体参与（图11-29）。自身剪接内含子的RNA具有催化功能，是一种核酶（ribozyme）。有关核酶的具体内容，可参见第三章。

小　　结

DNA依赖的RNA聚合酶以DNA为模板，以5′-三磷酸核苷为原料催化合成与模板互补的RNA，这个过程称为转录。转录有RNA聚合酶与启动子结合、起始、延长和终止几个阶段，RNA合成的方向是从5′→3′。原核RNA聚合酶只有一种，全酶形式是$\sigma\alpha_2\beta\beta'$，以$\sigma$亚基识别启动子，核心酶$\alpha_2\beta\beta'$催化合成mRNA、rRNA和tRNA。原核生物的转录终止有两种方式：ρ因子依赖终止和ρ因子不依赖终止。

真核细胞的核内具有3种RNA聚合酶。RNA聚合酶Ⅰ合成rRNA前体，RNA聚合酶Ⅱ合成mRNA前体，RNA聚合酶Ⅲ合成tRNA和5S rRNA前体。真核RNA聚合酶由多亚基组成，结构复杂。聚合酶Ⅱ与启动子的结合需要多种转录因子参与；聚合酶Ⅱ最大亚基有羧基末端结构域（CTD），在转录起始和延长阶段被磷酸化。

原核rRNA和tRNA的前体要经过加工才能成为成熟的rRNA和tRNA，mRNA不需要加工。真核mRNA前体的5′端加上7-甲基鸟嘌呤核苷残基的帽结构，3′端通过断裂及多聚腺苷酸化加上多聚腺苷酸尾结构，内含子通过剪接切除。真核mRNA前体内含子有特殊结构：5′剪接位、3′剪接位和分支点A。剪接的转酯反应在剪接体进行，剪接体含有小核核蛋白颗粒（snRNPs）。一个前体mRNA分子可经过剪接和剪切两种模式而加工成多个mRNA分子。真核rRNA和tRNA的前体由一些特异的核酸酶切除间隔序列，某些碱基经过化学修饰后，成为成熟的rRNA和tRNA。有些真核的rRNA、tRNA和mRNA前体含有自身剪接内含子，这类内含子的剪接不需要蛋白质参与，内含子自身的RNA具有催化剪接的功能。有些mRNA要经过编辑，才能作为翻译的模板。

（张玉祥）

第十二章　蛋白质的生物合成

蛋白质生物合成也称为翻译（translation），是细胞内以 mRNA 为模板、按照 mRNA 分子中由核苷酸组成的密码信息合成蛋白质的过程。其本质是将 mRNA 分子中 4 种核苷酸序列编码的遗传信息（核酸语言），解读为蛋白质一级结构中 20 种氨基酸的排列顺序（蛋白质语言）。根据中心法则阐明的规律，DNA 通过转录将遗传信息传递至 mRNA 分子，再通过翻译将遗传信息从 mRNA传递到蛋白质分子中；蛋白质是遗传信息表现的功能形式，是生命活动的物质基础，它赋予细胞乃至个体的生物学功能或表型。

蛋白质的生物合成包括 3 个反应过程：①氨基酸的活化过程，即各种氨基酸分别加载到各自的 tRNA 分子上，形成氨基酰-tRNA；②肽链的生物合成过程，即将 mRNA 的碱基排列顺序转换成肽链中氨基酸的排列顺序，并通过肽键将氨基酸连接起来；③肽链形成后的加工过程，即肽链合成后通过折叠形成天然蛋白质的三维构象、并对一级结构和空间结构进行修饰等，才成为有生物学功能的天然蛋白质。此外，多种蛋白质在胞液合成后还需要定向输送到相应细胞部位发挥作用。

蛋白质生物合成是一个涉及数百种分子参与的复杂的耗能过程，细胞用于合成蛋白质所消耗的能量占细胞内所有生物合成反应总能耗的 90%，蛋白质生物合成所需能量由 GTP 和 ATP 供给。

蛋白质生物合成在细胞生命过程中有至关重要的核心作用。生物体的多种生命活动如生长发育、对环境的适应及组织修复，都与蛋白质的合成有关。各种细胞需要不断地以极高的速度合成各种新蛋白质以满足代谢需要及应对环境的变化。很多抗菌药物正是通过干扰、抑制病菌的蛋白质合成过程而发挥作用的。

第一节　蛋白质生物合成体系

蛋白质的生物合成是一个由多种分子参与的复杂过程。20 种被编码氨基酸是蛋白质生物合成的基本原料，mRNA、tRNA 和核糖体分别是蛋白质生物合成的模板、“适配器”和“装配机”。此外，参与氨基酸活化及肽链合成的起始、延长和终止阶段的多种蛋白质因子、其他蛋白质、酶类、供能物质和某些无机离子也是蛋白质生物合成不可缺少的。

一、mRNA 是蛋白质生物合成的直接模板

遗传信息虽然存在于 DNA 分子中，但 DNA 并不直接指导蛋白质的生物合成。DNA 通过转录生成 mRNA 后，mRNA 就含有与 DNA 分子中某些功能片段相对应的碱基序列。以 mRNA 为模板合成蛋白质的多肽链时，这些碱基序列信息就转化为多肽链中氨基酸的排列顺序。所以，mRNA 是蛋白质生物合成的直接模板。

不同 mRNA 序列的分子大小和碱基排列顺序各不相同，但都具有 5′-端非翻译区、开放阅读框架区和 3′ 端非翻译区；真核生物 mRNA 的 5′-端还有帽子结构、3′-端有长度不一的多聚腺苷酸（poly A）尾。帽子结构能与帽子结合蛋白复合物结合，在翻译时参与 mRNA 在核糖体上的定位结合，启动蛋白质生物合成；帽子结构与 poly A 尾还具有稳定 mRNA 的作用；开放阅读框架区与编码蛋白质的基因序列相对应。在原核细胞中，数个结构基因常串联排列而构成一个转录单位，转录生成的 mRNA 可编码几种功能相关的蛋白质，为多顺反子 mRNA，转录后一般不需特别加工；真核细胞的一个 mRNA 分子只编

码一种蛋白质，为单顺反子 mRNA，转录后需要加工、成熟才能成为翻译的模板。每一细胞中可存在数千种不同的蛋白质，随时有新蛋白质合成。所以 mRNA 代谢非常活跃，各种 RNA 中 mRNA 的半衰期最短。

在 mRNA 的开放阅读框架区，以每 3 个相邻的核苷酸为一组，代表一种氨基酸或其他信息，这种存在于 mRNA 的开放阅读框架区的三联体形式的核苷酸序列称为密码子（codon）。由 A、G、C、U 这 4 种核苷酸可组合成 64 个三联体密码子（$C_4^1 \cdot C_4^1 \cdot C_4^1 = 4\times4\times4=64$）。在 64 个密码子中，有 61 个密码子分别代表不同的氨基酸（表 12-1）。AUG 既编码多肽链中的甲硫氨酸，又作为多肽链合成的起始信号。作为起始信号的 AUG 称为起始密码子（initiation codon）。在某些原核生物中，GUG 和 UUG 也可充当起始密码子。另有 3 个密码子 UAA、UAG、UGA 不编码任何氨基酸，只作为肽链合成终止的信号，称为终止密码子（termination codon）。从 mRNA 5′-端的起始密码子 AUG 到 3′-端终止密码子之间的核苷酸序列，称为开放阅读框架（open reading frame，ORF），通常的 ORF 包含 500 个以上的密码子。

表 12-1　遗传密码表

第一核苷酸 (5′)	第二核苷酸 U	第二核苷酸 C	第二核苷酸 A	第二核苷酸 G	第三核苷酸 (3′)
U	苯丙氨酸 UUU	丝氨酸 UCU	酪氨酸 UAU	半胱氨酸 UGU	U
	苯丙氨酸 UUC	丝氨酸 UCC	酪氨酸 UAC	半胱氨酸 UGC	C
	亮氨酸 UUA	丝氨酸 UCA	终止密码 UAA	终止密码 UGA	A
	亮氨酸 UUG	丝氨酸 UCG	终止密码 UAG	色氨酸 UGG	G
C	亮氨酸 CUU	脯氨酸 CCU	组氨酸 CAU	精氨酸 CGU	U
	亮氨酸 CUC	脯氨酸 CCC	组氨酸 CAC	精氨酸 CGC	C
	亮氨酸 CUA	脯氨酸 CCA	谷氨酰胺 CAA	精氨酸 CGA	A
	亮氨酸 CUG	脯氨酸 CCG	谷氨酰胺 CAG	精氨酸 CGG	G
A	异亮氨酸 AUU	苏氨酸 ACU	天冬酰胺 AAU	丝氨酸 AGU	U
	异亮氨酸 AUC	苏氨酸 ACC	天冬酰胺 AAC	丝氨酸 AGC	C
	异亮氨酸 AUA	苏氨酸 ACA	赖氨酸 AAA	精氨酸 AGA	A
	甲硫氨酸 AUG	苏氨酸 ACG	赖氨酸 AAG	精氨酸 AGG	G
G	缬氨酸 GUU	丙氨酸 GCU	天冬氨酸 GAU	甘氨酸 GGU	U
	缬氨酸 GUC	丙氨酸 GCC	天冬氨酸 GAC	甘氨酸 GGC	C
	缬氨酸 GUA	丙氨酸 GCA	谷氨酸 GAA	甘氨酸 GGA	A
	缬氨酸 GUG	丙氨酸 GCG	谷氨酸 GAG	甘氨酸 GGG	G

遗传密码具有以下重要特点：

（一）方向性

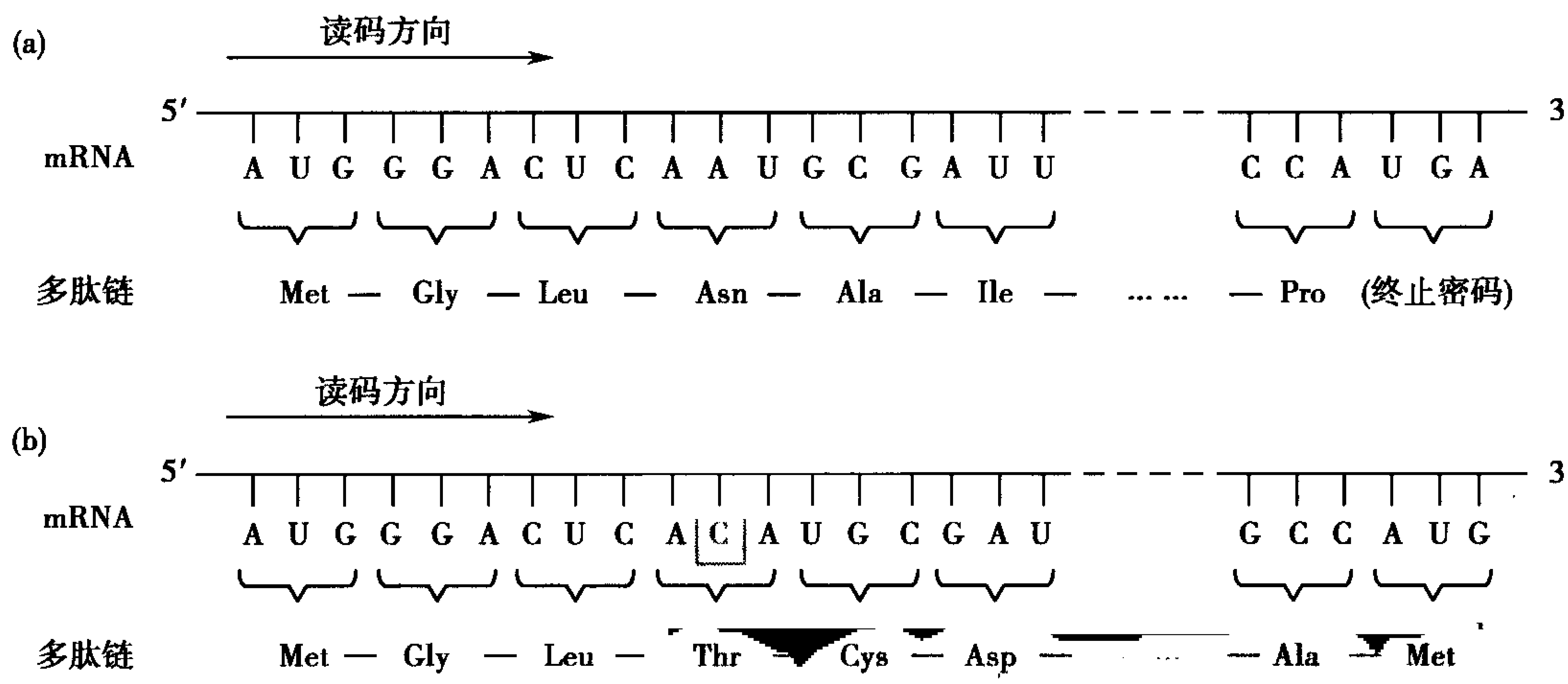
密码子及组成密码子的各碱基在 mRNA 序列中的排列具有方向性（direction），翻译时的阅读方向只能是 5′→3′，即读码从 mRNA 的起始密码子 AUG 开始，按 5′→3′的方向逐一阅读，直至终止密码子。这样，mRNA 阅读框架中从 5′-端到 3′-端排列的核苷酸顺序就决定了多肽链中从氨基端（N-端）到羧基端（C-端）的氨基酸排列顺序，即氨基酸的排列顺序与 mRNA 序列中密码子的排列顺序相对应［图 12-1(a)］。

（二）连续性

mRNA 序列上的各个密码子及密码子的各碱基是连续排列的，密码子及密码子的各碱基之间没有间隔，即具有无标点性（non-punctuation）。翻译时从起始密码子 AUG 开始向 3′-端连续读码，每次读码时每个碱基只读一次，不重叠阅读。基于遗传密码的连续性，

mRNA 分子中如有一个（或非 3n 个）核苷酸插入或缺失，就会使此后的读码产生错译，造成下游翻译产物氨基酸序列的改变，合成一条不是原来意义上的多肽链［图 12-1（b）］，由此而引起的突变称为框移突变（frameshift mutation）。

许多真核生物基因转录后有一个对 mRNA 外显子加工的过程，可通过特定碱基的插入、缺失或置换，使 mRNA 序列中出现移码突变、错义突变或无义突变，导致 mRNA 与其 DNA 模板序列不匹配，使同一前体 mRNA 翻译出序列、功能不同的蛋白质。这种基因表达的调节方式称为 mRNA 编辑（mRNA editing）。



●图 12-1　遗

（a）氨基酸的排列顺序对应于 mRNA 序列中密码子的排列顺序；（b）核苷酸插入导致框移突变；C 为插入的核苷酸

（三）简并性

一种氨基酸可具有两个或两个以上的密码子为其编码，这一特性称为遗传密码的简并性（degenerate）。遗传密码表中显示，每个密码子仅编码一种氨基酸，但除甲硫氨酸和色氨酸只对应 1 个密码子外，其他氨基酸都有 2、3、4 或 6 个密码子为之编码。为同一种氨基酸编码的各密码子称为简并性密码子，也称同义密码子，如苯丙氨酸就有 UUU、UUC 两个同义密码子。多数情况下，同义密码子的头两位碱基相同，仅第三位碱基有差异，即密码子的特异性主要由头两位核苷酸决定（“三中读二”），如丙氨酸的密码子是 GCU、GCC、GCA、GCG，而 ACU、ACC、ACA、ACG 都编码苏氨酸。这意味着第三位碱基的改变往往不改变其密码子编码的氨基酸，从而使合成的蛋白质结构不变。因此，遗传密码的简并性对于减少基因突变对蛋白质功能的影响具有一定的生物学意义。

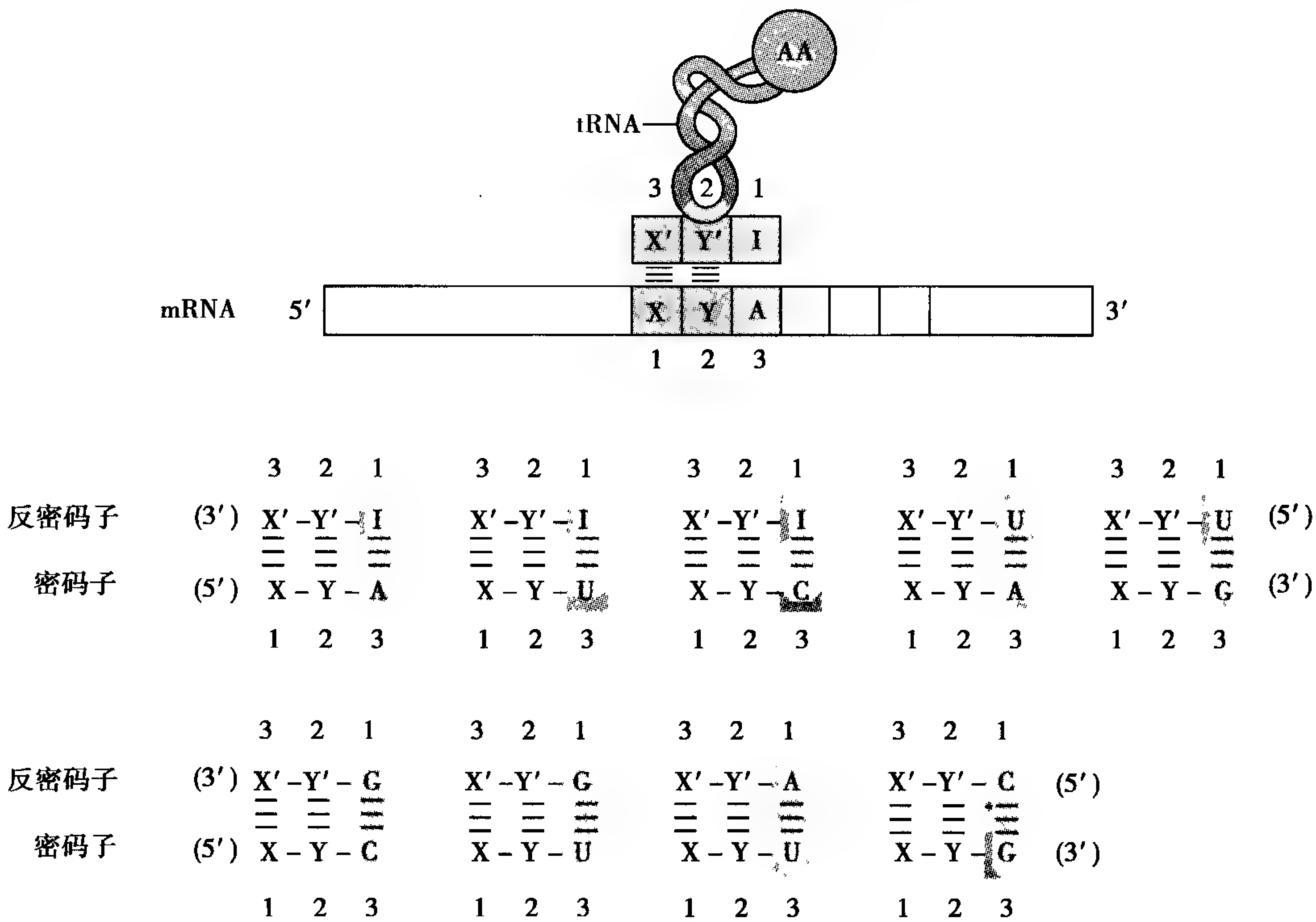
（四）通用性

从简单的病毒到高等的人类，几乎使用同一套遗传密码，因此，遗传密码表中的这套“通用密码”基本上适用于生物界的所有物种，具有通用性（universal）。这表明各种生物是从同一祖先进化而来的。但动物细胞的线粒体和植物细胞的叶绿体内所使用的遗传密码与“通用密码”有差别，线粒体中存在独立的基因表达体系，如用 AUA 兼作甲硫氨酸密码子和起始密码子，终止密码子可为 AGA、AGG，而 UGA 编码色氨酸等。

（五）摆动性

tRNA 序列中的反密码子能与 mRNA 序列中相应的密码子配对结合。反密码子与密码子配对时，遵循反向互补的原则。从 5′-端向 3′-端计数时，密码子的第 1 位碱基与反密码子的第 3 位碱基之间、两者中间的碱基之间以及密码子的第 3 位碱基与反密码子的第 1 位碱基之

间互补配对。但反密码子与密码子之间的配对并不严格遵守常见的碱基配对规律，称为摆动配对（wobble base pairing）。摆动配对在反密码子的第 1 位碱基与密码子的第 3 位碱基之间最为常见，如 tRNA 分子中的反密码子第 1 位有次黄嘌呤核苷（inosine，I）出现，可分别与 mRNA 分子中的密码子第 3 位的 A、U 或 C 配对；反密码子第 1 位的 U 可分别与密码子第 3 位的 A 或 G 配对；反密码子第 1 位的 G 可分别与密码子第 3 位的 C 或 U 配对（图 12-2）。由此可见，摆动配对能使 1 种 tRNA 识别 mRNA 的 1～3 种简并性密码子。



●图 12-2　密码子、反密码子的摆动配对
X 与 X′、Y 与 Y′为互补碱基对

遗传密码的破译

20 世纪中叶，人们已经知道 DNA 是遗传信息的携带分子，并通过 RNA 控制蛋白质的生物合成。此后，一些科学家即开始从不同角度去破译遗传密码。

20 世纪 60 年代初，M. W. Nirenbreg 等人推断出 64 个三联体密码子，并利用人工合成的均聚尿嘧啶核苷酸（poly U）为模板，在体外无细胞蛋白质合成体系中合成了多聚苯丙氨酸，从而解读出第一个“象形文字”——UUU 代表苯丙氨酸。其后，他们又用同样的方法证明 CCC、AAA 分别代表脯氨酸和赖氨酸。另外，H. G. Khorana 等将化学合成与酶促合成巧妙地结合起来，合成含有重复序列的多核苷酸共聚物，并以此为模板确定了半胱氨酸、缬氨酸等密码子。tRNA 发现者之一的 R. W. Holley 成功地制备了一种纯的 tRNA，标志着有生物学活性的核酸的化学结构的确定。

经过多位科学家不到 5 年的共同努力，于 1966 年确定了 64 个密码子的意义，在现代生物学研究史上写下了最激动人心的篇章。Nirenbreg、Khorana、Holley 这三位美国科学家因此共同荣获 1968 年诺贝尔生理医学奖。

二、核糖体是蛋白质生物合成的场所

核糖体又称核蛋白体，是由 rRNA 和蛋白质组成的复合体。参与蛋白质生物合成的各种成分最终都要在核糖体上将氨基酸合成多肽链。所以，核糖体是蛋白质生物合成的场所。

核糖体在蛋白质生物合成中的重要作用和它的成分及结构密切相关。各种细胞核糖体都有大、小两个亚基，每个亚基都由多种核糖体蛋白质（ribosomal protein，rp）和 rRNA 组成。大、小亚基所含蛋白质分别称为 rpL 和 rpS，它们多是参与蛋白质生物合成过程的酶和蛋白质因子。rRNA 分子含较多局部螺旋结构区，可折叠形成复杂的三维构象作为亚基的结构骨架，使各种核糖体蛋白质附着结合，装配成完整亚基。如表 12-2 所示，原核细胞的大亚基（50S）由 23S rRNA、5S rRNA 和 36 种蛋白质组成；小亚基（30S）由 16S rRNA 和 21 种蛋白质组成，大、小亚基结合形成 70S 的核糖体。真核细胞的大亚基（60S）由 28S rRNA、5. 8S rRNA、5S rRNA 和 49 种蛋白质组成；小亚基（40S）由 18S rRNA 和 33 种蛋白质组成，大、小亚基结合形成 80S 的核糖体。

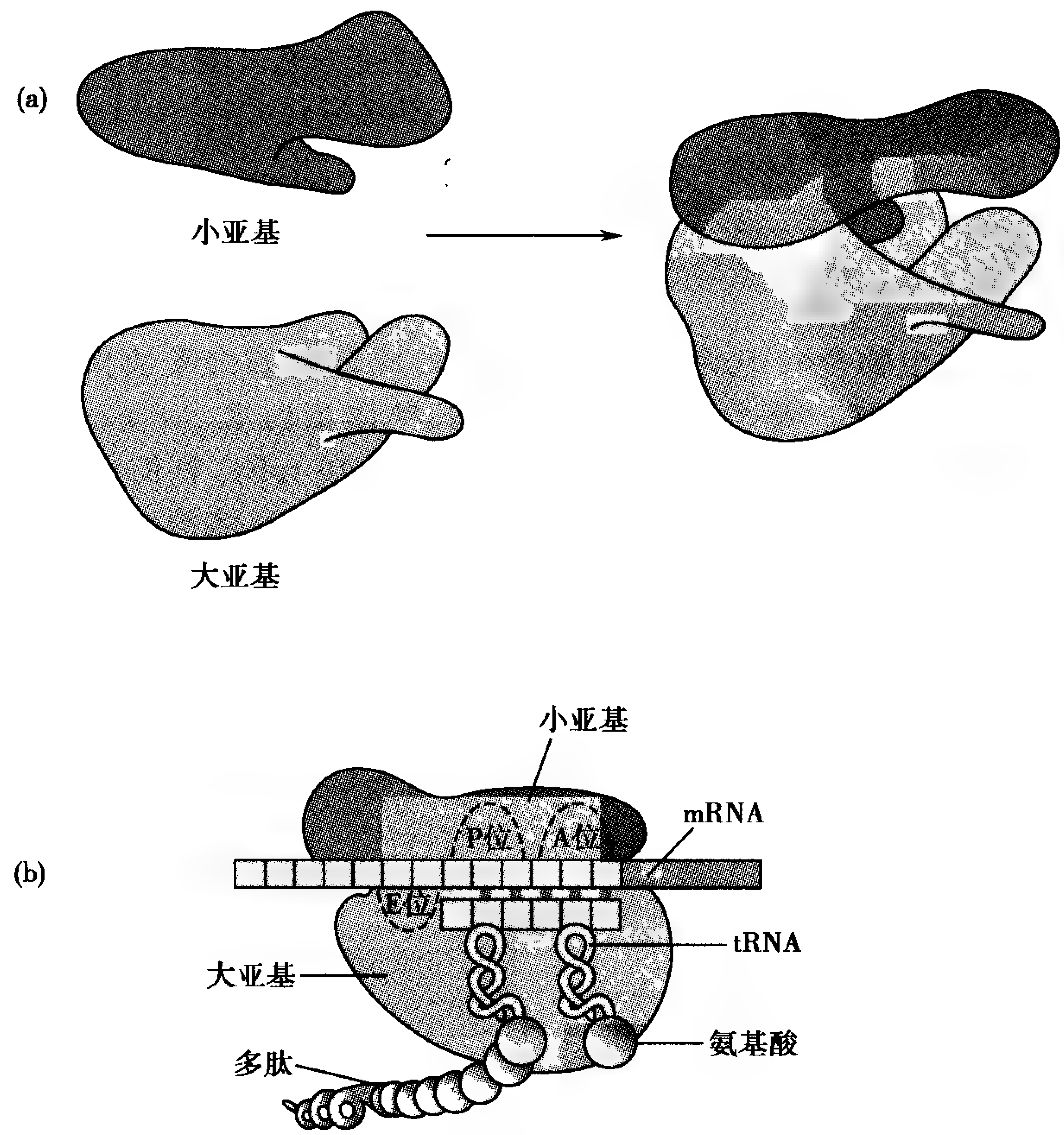
表 12-2　原核、真核生物核糖体的组成

	原核生物			真核生物		
	核糖体	小亚基	大亚基核	蛋白体	小亚基	大亚基
S值	70S	30S	50S	80S	40S	60S
rRNA		16S rRNA	23S rRNA		18S rRNA	28S rRNA
			5S rRNA			5. 8S rRNA
						5S rRNA
蛋白质		21 种 rpS	36 种 rpL		33 种 rpS	49 种 rpL

原核生物核糖体的两个亚基三维构象不规则。大小亚基间存在裂隙，是 mRNA 及 tRNA的结合部位［图 12-3（a）］。真核生物的核糖体结构与原核生物的相似，但组分更复杂。原核生物核糖体上有 3 个位点［图 12-3（b）］，结合氨基酰-tRNA 的氨基酰位（aminoacyl site）称 A 位，结合肽酰 tRNA 的肽酰位（peptidyl site）称 P 位，两者都是由大、小亚基蛋白质成分共同构成。排出卸载 tRNA 的排出位（exit site）称 E 位，主要是大亚基成分。真核细胞核糖体没有 E 位。每个位点均与 mRNA 序列上的密码子相对应。当肽酰-tRNA结合在 P 位、另一氨基酰-tRNA 结合在 A 位时，两个 tRNA 的反密码子也就正好与mRNA的两个密码子互补结合，而转肽酶就位于这两个位点之间。在转肽酶的作用下，肽酰基被转移到位于 A 位的氨基酰-tRNA 的氨基上，两者之间形成肽键，这样，A 位上的氨基酸就被添加到肽链中，肽链得以延长。

三、tRNA 是氨基酸的运载工具及蛋白质生物合成的适配器

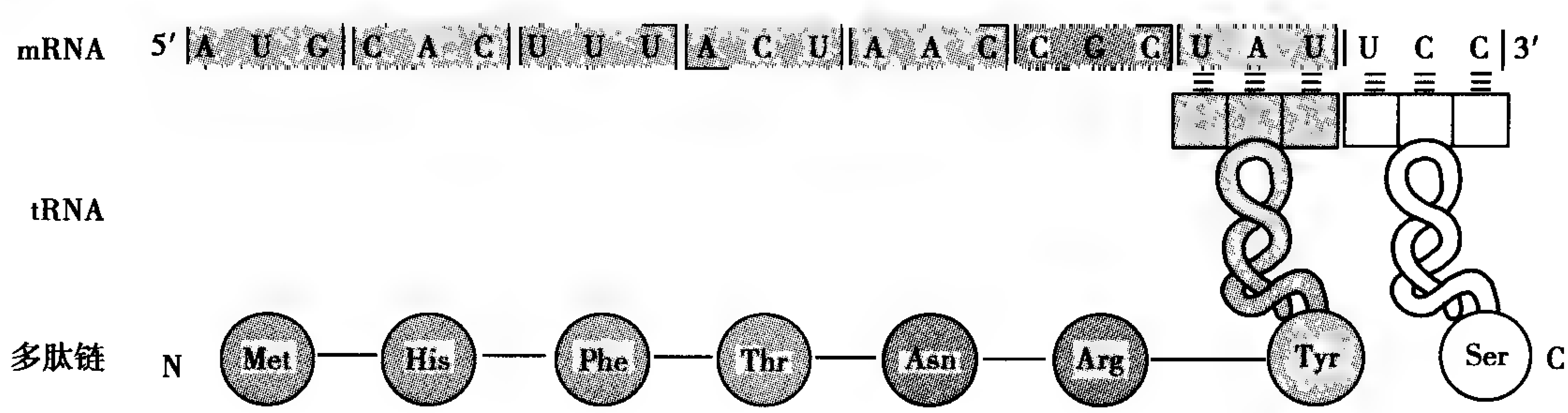
分散存在于胞液中的氨基酸需要由 tRNA 搬运到核糖体上才能组装成多肽链，所以 tRNA 起着运载氨基酸的作用。tRNA 还起适配器（adaptor）的作用，即 mRNA 序列中



●图 12-3　原核生物核糖体结构模式
(a) 核蛋白体大、小亚基结合后形成的亚基间裂隙为 mRNA 结合部位；(b) 翻译过程中的核蛋白体结构模式

密码子的排列顺序通过 tRNA“改写”成多肽链中氨基酸的排列顺序。

tRNA 具有两个关键部位：一个是氨基酸结合部位；另一个是 mRNA 结合部位。氨基酸结合部位是 tRNA 氨基酸臂的—CCA 腺苷酸 3′-羟基。氨基酸被 tRNA 转运至核糖体之前，各种氨基酸须被分别加载到各自的 tRNA 分子上，形成氨基酰-tRNA。氨基酰-tRNA是氨基酸的活化形式，它是氨基酸的 α-羧基与 tRNA 的 3′-CCA 末端的羟基之间形成酯键后，氨基酸与 tRNA 相连接而成的产物。tRNA 与 mRNA 的结合部位是 tRNA 的反密码子。反密码子能与 mRNA 序列中相应的密码子互补结合，于是，tRNA 所携带的氨基酸就可以准确地在 mRNA 序列上“对号入座”，从而使形成肽链的氨基酸按 mRNA 规定的顺序排列起来（图 12-4）。



●图 12-4　tRNA 的适配器作用

四、蛋白质生物合成需要酶类、蛋白质因子等

（一）重要的酶类

参与蛋白质生物合成的重要酶有：①氨基酰-tRNA 合成酶，存在于胞液中，催化氨基酸的活化；②转肽酶，是核糖体大亚基的组成成分，催化核糖体 P 位上的肽酰基转移至 A 位氨基酰-tRNA 的氨基上，使酰基与氨基结合形成肽键，它受释放因子的作用后发生变构，表现出酯酶的水解活性，使 P 位上的肽链与 tRNA 分离；③转位酶，其活性存在于延长因子 G 中，催化核糖体向 mRNA 的 3′-端移动一个密码子的距离，使下一个密码子定位于 A 位。

（二）蛋白质因子

在蛋白质生物合成的各阶段有很多重要的非核糖体蛋白质因子参与反应。翻译时它们仅临时性地与核糖体发生作用，之后会从核糖体复合物中解离出来，主要有：①起始因子（initiation factor，IF），原核生物（prokaryote）和真核生物（eukaryote）的起始因子分别用 IF 和 eIF 表示；②延长因子（elongation factor，EF），原核生物与真核生物的延长因子分别用 EF 和 eEF 表示；③释放因子（release factor，RF）又称终止因子（termination factor），原核生物与真核生物的释放因子分别用 RF 和 eRF 表示。参与蛋白质生物合成的各种已知蛋白质因子见表 12-3 和表 12-4。

（三）能源物质及离子

蛋白质生物合成的能源物质为 ATP 和 GTP。参与蛋白质生物合成的无机离子有 Mg^{2+} 和 K^{+} 等。

第二节　氨基酸的活化

氨基酸与特异的 tRNA 结合形成氨基酰 tRNA 的过程称为氨基酸的活化。

一、氨基酸活化形成氨基酰-tRNA

氨基酰-tRNA 由氨基酰-tRNA 合成酶（aminoacyl-tRNA synthetase）催化生成，每个氨基酸活化需消耗 2 个高能磷酸键。

$$\text{氨基酸} + \text{tRNA} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{氨基酰-tRNA合成酶}} \text{氨基酰-tRNA} + \text{AMP} + \text{PPi}$$

氨基酰-tRNA 合成酶（E）催化氨基酰-tRNA 合成过程分两步。首先，氨基酸结合于 AMP-酶（AMP-E），形成中间产物，AMP-E 通过消耗 ATP 生成。其次才生成氨基酰-tRNA。

$$\text{氨基酸} + \text{ATP-E} \longrightarrow \text{氨基酰-AMP-E} + \text{PPi}$$

$$\text{氨基酰-AMP-E} + \text{tRNA} \longrightarrow \text{氨基酰-tRNA} + \text{AMP} + \text{E}$$

细胞中的焦磷酸酶不断分解反应生成的 PPi，促进反应持续向右进行。反应中氨基酸的 α-羧基与 tRNA 的 3′-CCA 腺苷酸的 3′-OH 以酯键连接，形成氨基酰-tRNA。氨基酰-tRNA 的合成伴随肽链合成的起始、延长阶段不断进行。如用三字母缩写代表氨基酸，各种氨基酸和对应的 tRNA 结合后形成的氨基酰-tRNA 可以表示为：氨基酸的三字母缩写-$tRNA^{\text{氨基酸的三字母缩写}}$，如 Ala-$tRNA^{Ala}$，Ser-$tRNA^{Ser}$，Met-$tRNA^{Met}$ 等。氨基酰 tRNA 的生成

反应举例如下：

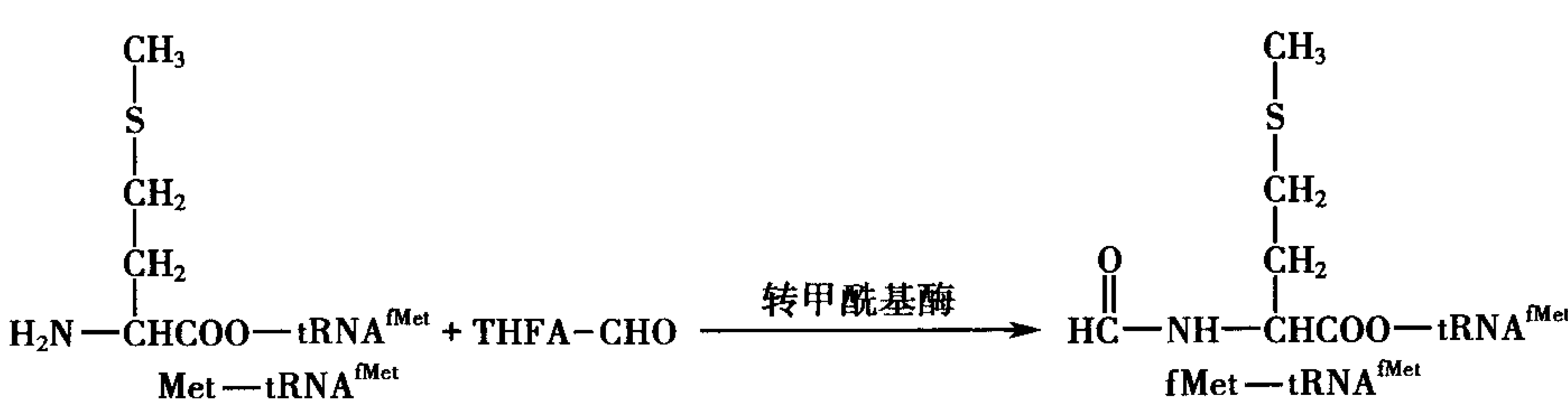
$$Gly + tRNA + ATP \xrightarrow{\text{氨基酰-tRNA合成酶}} Gly\text{-}tRNA^{Gly} + AMP + PPi$$

氨基酸与 tRNA 分子的正确结合，是保证遗传信息被准确翻译为蛋白质的关键步骤之一。一种氨基酸虽然通常可与 2～6 种对应的 tRNA 特异性结合（已发现的 tRNA 达 40～50 种），但一种 tRNA 只能转运一种特定的氨基酸，因此，氨基酰-tRNA 合成酶对底物氨基酸和 tRNA 都有高度特异性。该酶通过分子中相分隔的活性部位分别识别并结合 ATP、特异氨基酸和携带简并密码子的数种 tRNA。如 tRNA 分子氨基酸臂的 G、U 碱基对及 7 对碱基螺旋区等结构是被该酶特异识别的重要位点。此外，氨基酰 tRNA 合成酶具有校正活性（proofreading activity），即该酶可改正反应的任一步骤中出现的错配。校正活性实际上是水解酯键的催化活性，即将任何错误的氨基酰-AMP-E 或氨基酰-tRNA 的酯键水解，再换上与密码子相对应的氨基酸。氨基酰-tRNA 分子中 tRNA 的反密码子通过碱基配对识别 mRNA 分子上的密码子，使氨基酸按 mRNA 信息的指导"对号入座"，保证了从核酸到蛋白质的遗传信息传递的准确性。

二、真核生物起始氨基酰-tRNA 是 $Met\text{-}tRNAi^{Met}$

真核生物中与甲硫氨酸结合的 tRNA 至少有两种：一种是具有起始功能的 $tRNAi^{Met}$（initiator-tRNA），它与甲硫氨酸结合后，可以在 mRNA 的起始密码子 AUG 处就位，参与形成翻译的起始复合物；另一种是参与肽链延长的 $tRNA^{Met}$，它和甲硫氨酸结合后生成 Met $tRNA^{Met}$，必要时进入核糖体，为延长中的肽链添加甲硫氨酸。$Met\text{-}tRNAi^{Met}$ 和 Met $tRNA^{Met}$ 可分别被起始或延长过程起催化作用的酶和蛋白质因子所辨认。

原核生物中参与肽链延长的 $tRNA^{Met}$ 和甲硫氨酸结合后生成 $Met\text{-}tRNA^{Met}$，而具有起始功能的 $tRNA^{fMet}$ 与甲硫氨酸结合后，甲硫氨酸很快被甲酰化为 N-甲酰甲硫氨酸（N-formyl methionine，fMet），于是形成 N-甲酰甲硫氨酰-tRNA（$fMet\text{-}tRNA^{fMet}$）。原核生物的起始密码子只辨认 $fMet\text{-}tRNA^{fMet}$。$fMet\text{-}tRNA^{fMet}$ 的生成反应由转甲酰基酶催化，将甲酰基从 N^{10}-甲酰四氢叶酸（THFA）转移到甲硫氨酸的 α-氨基上，反应如下：



第三节　肽链的生物合成过程

肽链的生物合成过程是翻译的中心环节。翻译时，从 mRNA 的起始密码子 AUG 开始，按 5′→3′方向逐一读码，直至终止密码子。于是，合成中的肽链从起始甲硫氨酸开始，从 N-端向 C-端延长，直至终止密码子前一位密码子所编码的氨基酸。

一、原核生物的肽链合成过程

蛋白质生物合成的早期研究工作都是利用大肠杆菌的无细胞体系（cell-free system）

进行的，所以对大肠杆菌的蛋白质合成过程了解较多。翻译过程包括起始（initiation）、延长（elongation）和终止（termination）三个阶段，这三个阶段都是在核糖体上完成的，即广义上的核糖体循环。原核生物肽链的合成过程涉及众多的蛋白质因子（表 12-3）。

表 12-3　参与原核生物翻译的各种蛋白质因子及其生物学功能

	种类	生物学功能
起始因子	IF-1	占据 A 位防止结合其他 tRNA
	IF-2	促进 fMet-tRNA^{fMet}与小亚基结合
	IF-3	促进大、小亚基分离，提高 P 位对结合 fMet-tRNA^{fMet}的敏感性
延长因子	EF-Tu	促进氨基酰-tRNA 进入 A 位，结合并分解 GTP
	EF-Ts	调节亚基
	EF-G	有转位酶活性，促进 mRNA-肽酰-tRNA 由 A 位移至 P 位，促进 tRNA 卸载与释放
释放因子	RF-1	特异识别 UAA、UAG，诱导转肽酶转变为酯酶
	RF-2	特异识别 UAA、UGA，诱导转肽酶转变为酯酶
	RF-3	可与核糖体其他部位结合，有 GTP 酶活性，能介导 RF-1 及 RF-2 与核糖体的相互作用

（一）起始

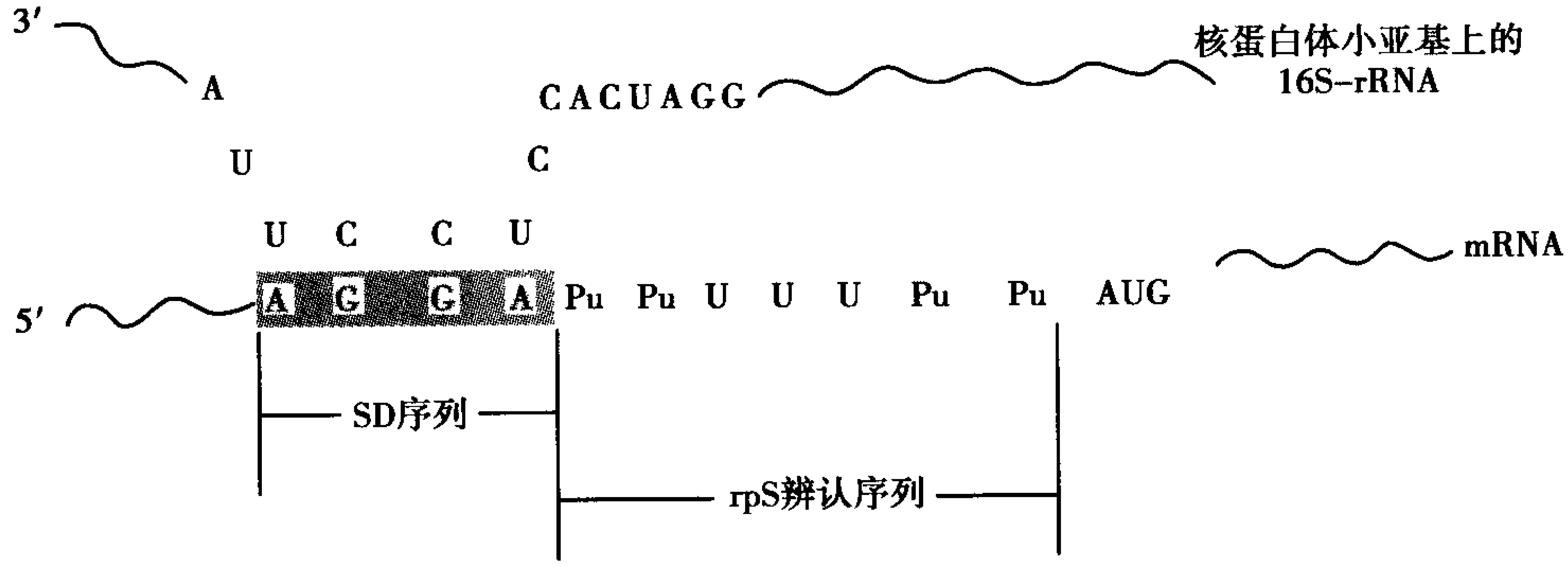
肽链合成的起始阶段是指 mRNA 和起始氨基酰-tRNA 分别与核糖体结合而形成翻译起始复合物（initiation complex）的过程。除需要 30S 小亚基、mRNA、fMet-tRNA^{fMet}和 50S 大亚基外，这一过程还需要 3 种起始因子、GTP 和 Mg^{2+}参与。

1. 核糖体大、小亚基分离　肽链的合成是一个连续的过程，上一轮合成的终止紧接下一轮合成的起始。这时完整核糖体的大、小亚基须拆离，准备 mRNA 和起始氨基酰-tRNA 与小亚基结合。IF-3、IF-1 与小亚基结合，促进大、小亚基分离。

2. mRNA 在小亚基上定位结合　一条 mRNA 链上可以有多个起始 AUG，形成多个 ORF，编码出多条多肽链。核糖体小亚基与 mRNA 结合时必须识别一个合适的起始 AUG，以便形成一个特异的 ORF，从而准确地翻译出目的蛋白质。原核生物 mRNA 在核糖体小亚基上的准确定位结合涉及两种机制：①在各种 mRNA 起始 AUG 上游约 8～13 个核苷酸部位，存在一段由 4～9 个核苷酸组成的一致序列，富含嘌呤碱基，如-AGGAGG-，称为 Shine-Dalgarno 序列（S-D 序列），又称核糖体结合位点（ribosomal binding site, RBS）。一条多顺反子 mRNA 序列上的每个基因编码序列均拥有各自的 S-D 序列和起始 AUG。小亚基中的 16S rRNA 3′-端有一富含嘧啶碱基的短序列，如-UCCUCC-，通过与 S-D序列碱基互补而使 mRNA 与小亚基结合；②mRNA 序列上紧接 S-D 序列后的小核苷酸序列，可被核糖体小亚基蛋白 rpS-1 识别并结合（图 12-5）。通过上述 RNA-RNA、RNA-蛋白质相互作用，mRNA 序列上的起始 AUG 即可在核糖体小亚基上准确定位而形成复合体。

3. fMet-tRNA^{fMet}的结合　翻译起始时 A 位被 IF-1 占据，不与任何氨基酰-tRNA 结合。fMet-tRNA^{fMet}与结合了 GTP 的 IF-2 一起，识别并结合对应于小亚基 P 位的 mRNA 序列上的起始密码子 AUG，这也促进 mRNA 的准确就位。

4. 核糖体大亚基结合　上述结合了 mRNA、fMet-tRNA^{fMet}的小亚基再与核糖体大亚



●图 12-5　原核生物 mRNA 与核蛋白体小亚基的结合定位

基结合，同时结合于 IF-2 的 GTP 被水解，释放的能量促使 3 种 IF 释放，形成由完整核糖体、mRNA、fMet-tRNA^{fMet}组成的翻译起始复合物。此时，结合起始密码子 AUG 的 fMet-tRNA^{fMet}占据 P 位，A 位留空，且对应于紧接在 AUG 后的密码子，为延长阶段的进位作好了准备（图 12-6）。

（二）延长

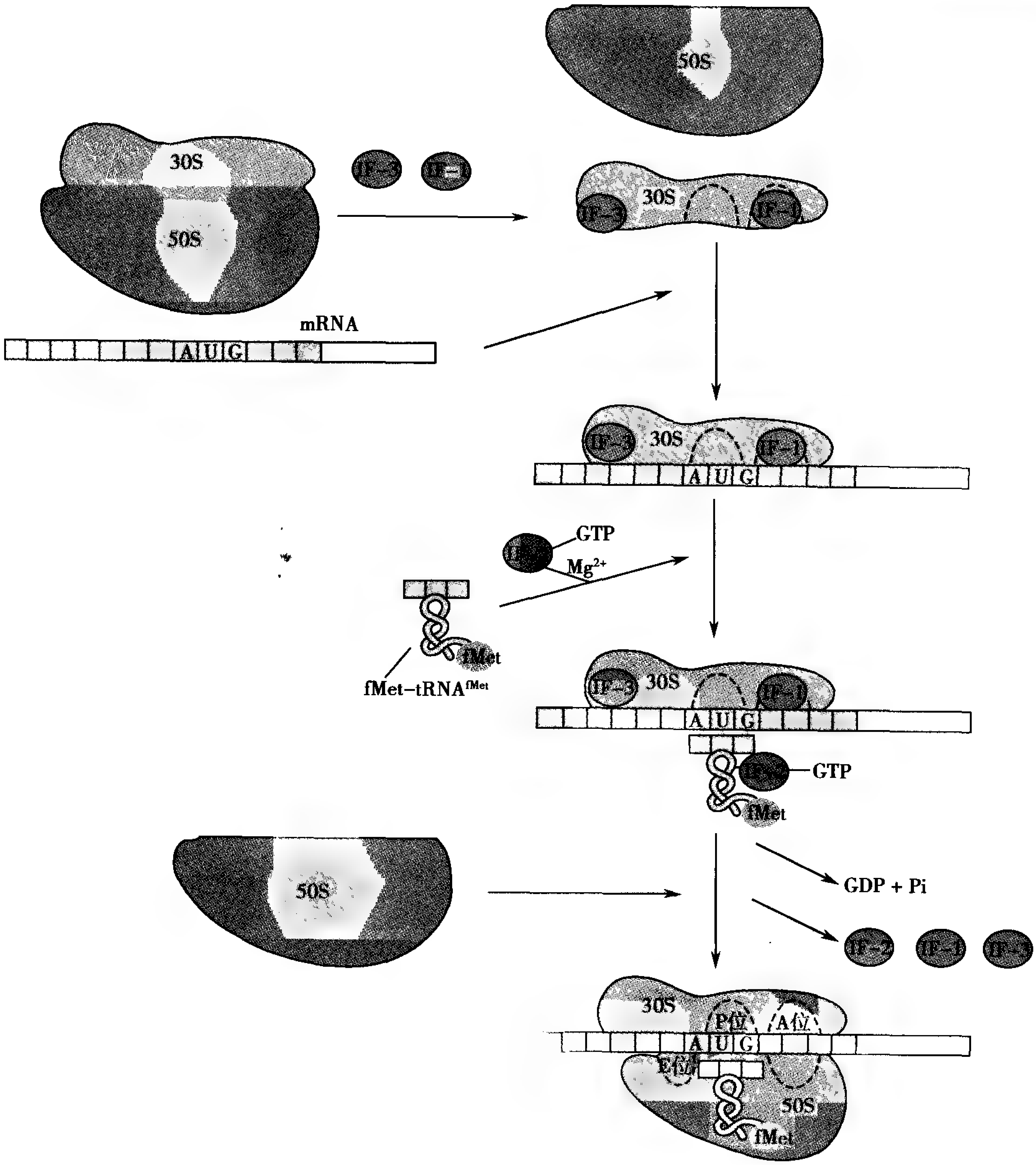
肽链合成的延长阶段是指在 mRNA 密码序列的指导下，氨基酸依次进入核糖体并聚合成多肽链的过程。这一阶段是在核糖体上连续循环进行的，所以又称核糖体循环（ribosomal cycle）。而广义的核糖体循环是指翻译的全过程。狭义上讲，每次核糖体循环，使肽链延长一个氨基酸。每个循环又分为三步，即进位（positioning）、成肽（peptide bond formation）和转位（translocation）。延长过程需要延长因子参与。

1. 进位　进位又称注册（registration），是指一个氨基酰 tRNA 按照 mRNA 模板的指令进入并结合到核糖体 A 位的过程。翻译起始复合物形成后，核糖体 P 位结合 fMet-tRNA^{fMet}，但 A 位留空且对应于 mRNA 中的下一组三联体密码，进入 A 位的氨基酰-tRNA即由该密码子决定。经过一次核糖体循环后，核糖体 P 位将结合肽酰-tRNA，同样是 A 位留空。

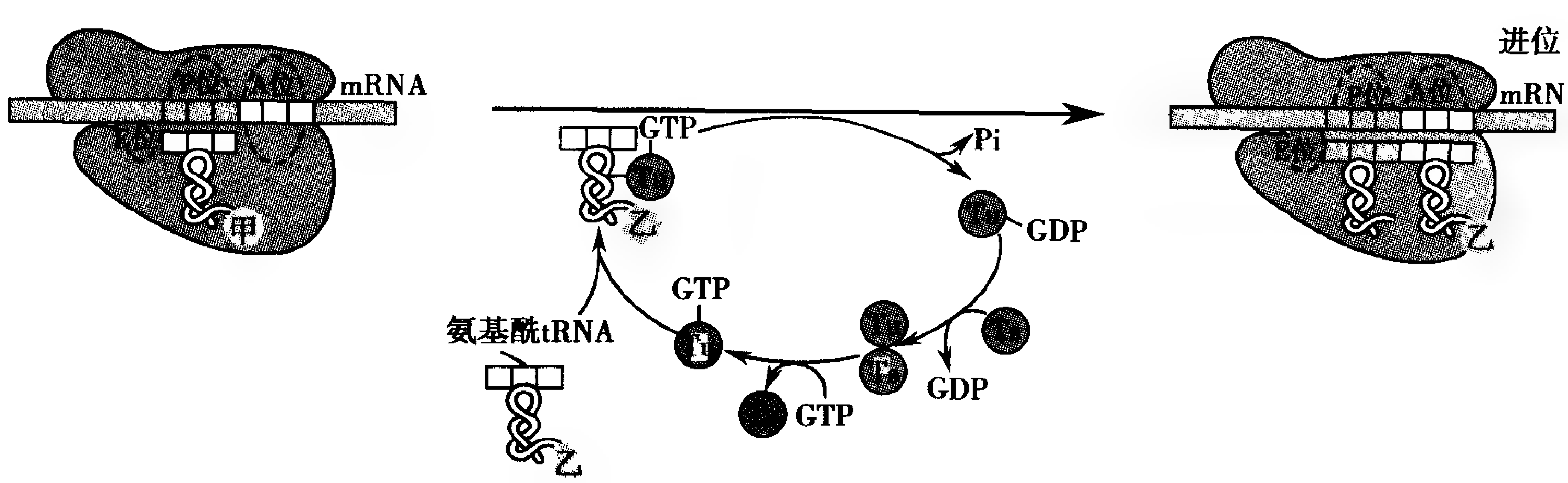
进位需要延长因子 EF-T 参与。EF-T 为 EF-Tu 和 EF-Ts 亚基的二聚体，EF-Tu 结合 GTP 后与 EF-Ts 分离。氨基酰-tRNA 在进入核糖体 A 位之前，必须首先与 EF-Tu-GTP 结合，然后以氨基酰-tRNA-Tu-GTP 活性复合物形式进入并结合 A 位。EF-Tu 有 GTP 酶活性，能水解 GTP 释能，驱动 EF-Tu 和 GDP 从核糖体释出，重新形成 Tu-Ts 二聚体，并继续催化下一氨基酰-tRNA 进位（图 12-7）。

核糖体对氨基酰 tRNA 的进位有校正作用。肽链生物合成以很高速度进行（如 37℃时大肠杆菌细胞的一个核糖体每秒钟可聚合 20 个氨基酸），要求延长阶段每一过程的速度与之适应。EF-Tu-GTP 仅存在数毫秒即被分解，在此时限内，只有正确的氨基酰-tRNA 能迅速发生反密码子-密码子适当配对而进入 A 位。反之，错误氨基酰-tRNA 因反密码子-密码子配对不能及时发生而从 A 位解离。这是维持蛋白质生物合成的高度保真性的另一机制。

2. 成肽　成肽是在转肽酶的催化下，核糖体 P 位上起始氨基酰-tRNA 的 N-甲酰甲硫氨酰基（真核生物为甲硫氨酰基）或肽酰-tRNA 的肽酰基转移到 A 位并与 A 位上氨基酰-tRNA 的 α-氨基结合形成肽键的过程。在这一过程中，结合于核糖体 A 位的氨基酰-tRNA 的氨基酸臂部分弯折，使该氨基酸在空间上接近 P 位。P 位的起始氨基酰-tRNA（或延长中的肽酰-tRNA）由酶催化，将氨基酰基（或延长中的肽酰基）从 tRNA 转移，与 A 位氨

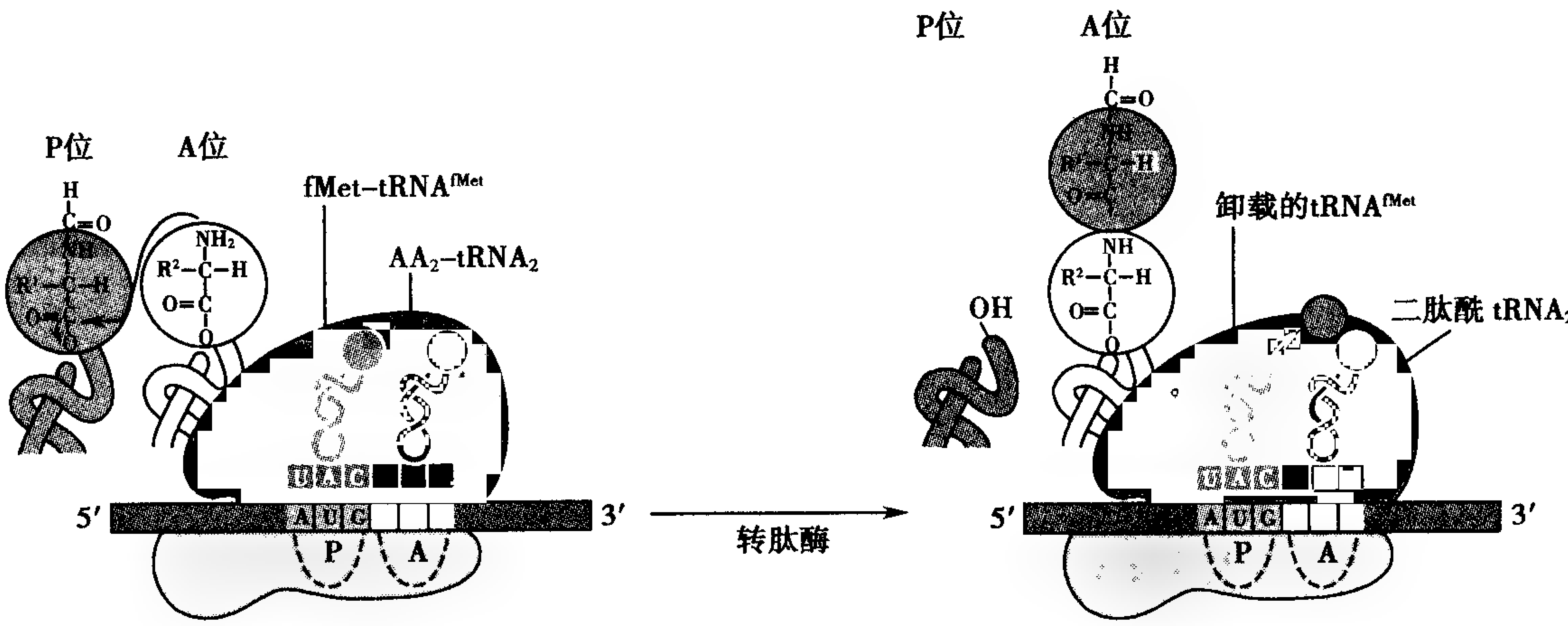


●图 12-6　原核生物肽链合成的起始



●图 12-7　原核生物肽链合成的进位过程

基酸的 α-氨基形成肽键连接，即成肽反应在 A 位上进行。第一个肽键形成后，二肽酰-tRNA占据核糖体 A 位，而卸载的 tRNA 仍在 P 位（图 12-8）。起始的 N-甲酰甲硫氨酸的 α-氨基因被持续保留而成为新生肽链的 N-端。

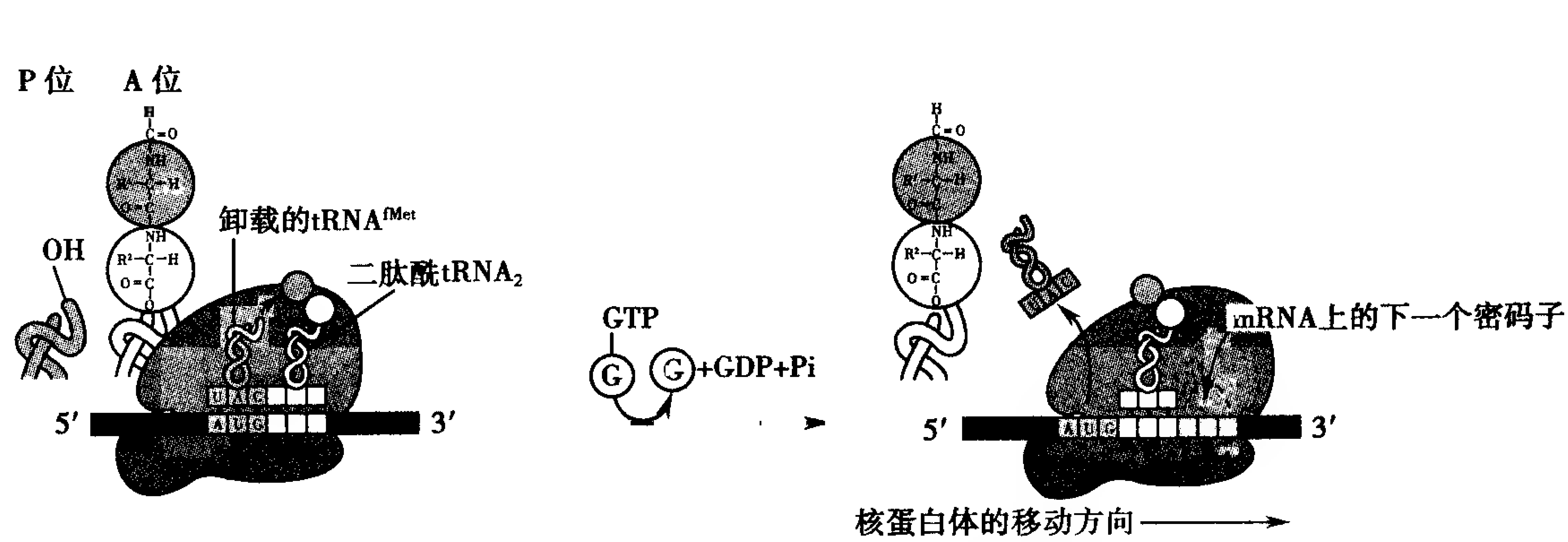


●图 12-8 原核生物肽链合成的肽键形成过程

3. 转位 转位是在转位酶的催化下，核糖体向 mRNA 的 3′-端移动一个密码子的距离，使 mRNA 序列上的下一个密码子进入核糖体的 A 位，而占据 A 位的肽酰-tRNA 移入 P 位的过程。延长因子 EF-G 有转位酶（translocase）活性，可结合并水解 1 分子 GTP，释放的能量促进核糖体向 mRNA 的 3′-侧移动，使起始二肽酰-tRNA-mRNA 相对位移进入核糖体 P 位，卸载的 tRNA 则移入 E 位，A 位留空并对应下一组三联体密码，准备适当氨基酰-tRNA 进位，开始下一轮核糖体循环。

在肽链合成连续进行时，核糖体空间构象发生着周期性改变，转位时卸载的 tRNA 进入 E 位，可诱导核糖体构象改变而有利于下一氨基酰-tRNA 进入 A 位；氨基酰-tRNA 的进位又诱导核糖体变构而促使卸载 tRNA 从 E 位排出（图 12-9）。

经过第二轮进位-成肽-转位循环，P 位出现三肽酰-tRNA，A 位留空并对应于第四个氨基酰-tRNA 进位。延长过程不断循环，使三肽酰-tRNA、四肽酰-tRNA 等陆续出现于核糖体 P 位，A 位留空，开始下一氨基酰-tRNA 进位。这样，核糖体从 5′→3′阅读mRNA 序列中的密码子，连续进行进位、成肽、转位的循环过程，每次循环向肽链 C-端添加一个氨基酸，使肽链从 N-端向 C-端延伸。

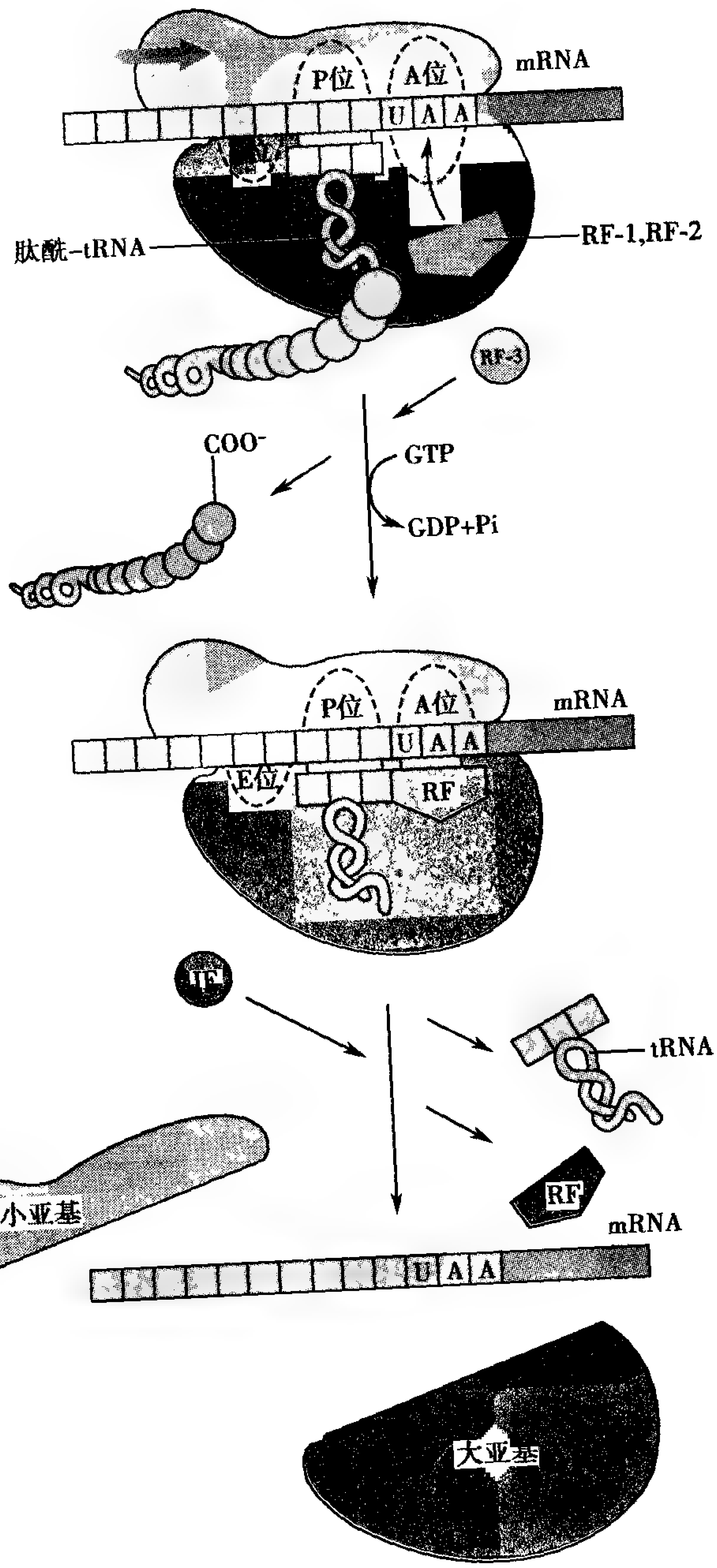


●图 12-9 原核生物肽链合成的转位过程

（三）终止

肽链合成的终止是指核糖体A位出现mRNA的终止密码子后，多肽链合成停止，肽链从肽酰-tRNA中释出，mRNA、核糖体大、小亚基等分离的过程。

当mRNA序列上的终止密码子在核糖体A位出现时，终止密码子不被任何氨基酰-tRNA识别和进位，只有释放因子能识别终止密码子而进入A位并与终止密码子结合，这一识别过程需要水解GTP。原核生物中，进入A位的释放因子为RF-1或RF-2。RF-1或RF-2结合终止密码子后可触发核糖体构象改变，将转肽酶活性转变为酯酶活性，水解新生肽链与结合在P位的tRNA之间的酯键，释出合成的肽链，并促使mRNA、卸



●图 12-10　原核生物肽链合成的终止

载的 tRNA 及 RF 从核糖体脱离。mRNA 模板和各种蛋白质因子、其他组分都可被重新利用。RF-3 可结合核糖体其他部位，有 GTP 酶活性，能介导 RF-1、RF-2 与核糖体的相互作用。紧接着经 IF-1、IF-3 介导核糖体大、小亚基分离而进入下一起始过程（图 12-10）。

二、真核生物的肽链合成过程

真核生物的肽链合成过程与原核生物的肽链合成过程基本类似，只是反应更复杂、涉及的蛋白质因子更多（表 12-4）。

表 12-4　参与真核生物翻译的各种蛋白质因子及其生物学功能

	种类	生物学功能
起始因子	eIF-1	多功能因子，参与翻译的多个步骤
	eIF-2	促进 Met-tRNAi^{Met}与小亚基结合
	eIF-2B	结合小亚基，促进大、小亚基分离
	eIF-3	结合小亚基，促进大、小亚基分离；介导 eIF-4F 复合物-mRNA 与核糖体小亚基结合
	eIF-4A	eIF-4F 复合物成分，有 RNA 解螺旋酶活性，解除 mRNA 5′-端的发夹结构，使其与小亚基结合
	eIF-4B	结合 mRNA，促进 mRNA 扫描定位起始 AUG
	eIF-4E	eIF-4F 复合物成分，结合 mRNA 5′-帽子
	eIF-4G	eIF-4F 复合物成分，结合 eIF-4E、eIF-3 和 PAB
	eIF-5	促进各种起始因子从小亚基解离，进而结合大亚基
	eIF-6	促进核糖体分离成大、小亚基
延长因子	eEF1-α	促进氨基酰-tRNA 进入 A 位，结合分解 GTP，相当于 EF-Tu
	eEF1-βγ	调节亚基，相当于 EF-Ts
	eEF-2	有转位酶活性，促进 mRNA-肽酰-tRNA 由 A 位移至 P 位，促进 tRNA 卸载与释放，相当于 EF-G
释放因子	eRF	识别所有终止密码子，具有原核生物各类 RF 的功能

（一）起始

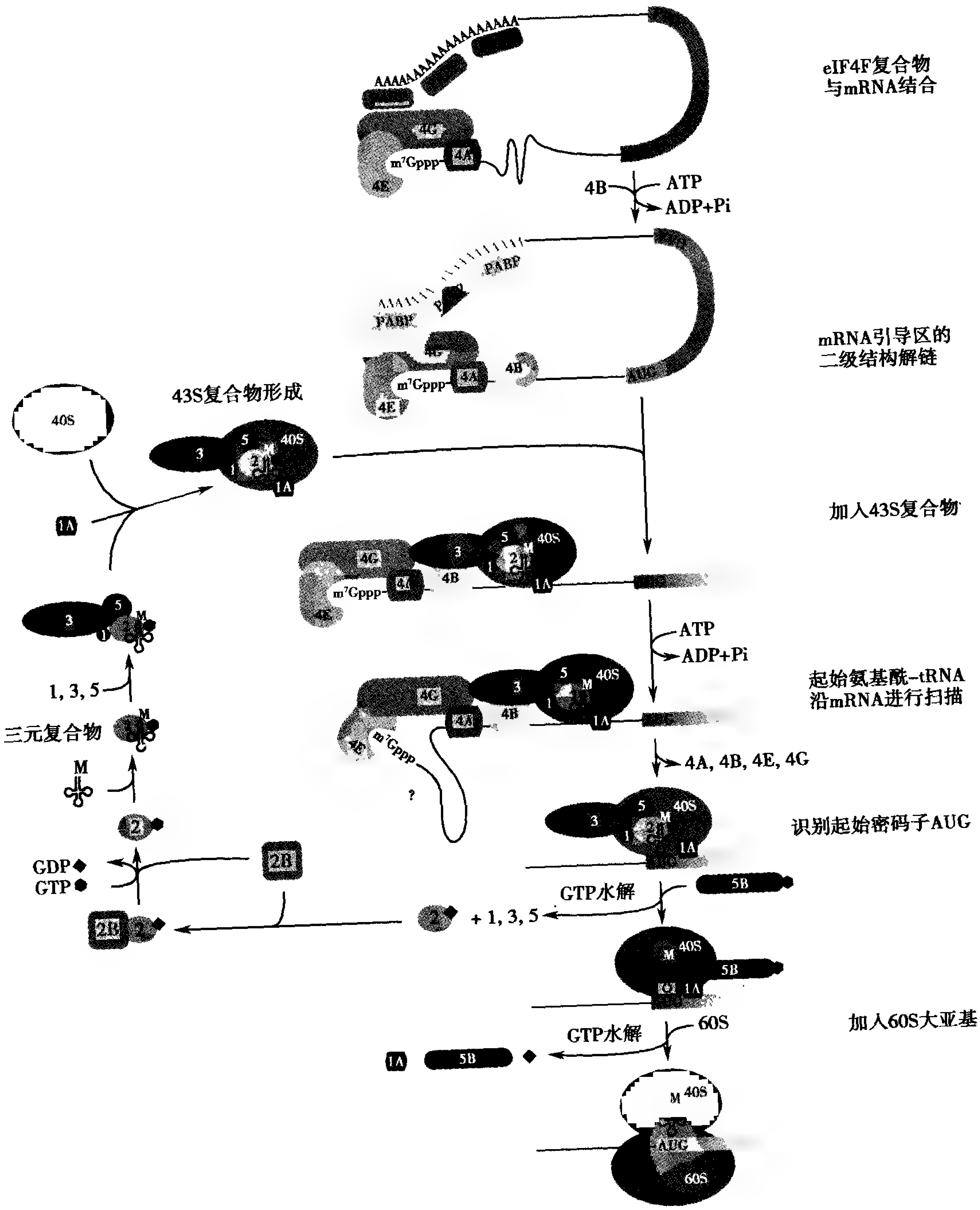
真核生物与原核生物在肽链合成的起始阶段差别较大。真核生物有不同的翻译起始成分，如核糖体为 80S（40S 小亚基和 60S 大亚基）；起始甲硫氨酸不需要被甲酰化；起始因子种类更多更复杂。真核生物的 mRNA 为单顺反子，起始 AUG 上游没有 S-D 序列，但有 5′-帽子和 3′-poly A 尾结构，依赖帽子结合蛋白复合物使 mRNA 在核糖体上定位结合；mRNA 的 5′-端可能有多个 AUG 密码子，但起始 AUG 位于 Kozak 共有序列（Kozak consensus sequence）中。Kozak 共有序列为起始 AUG 周围的一段短的通用序列即ACCAUGG，该序列突变可降低核糖体的翻译活性。真核生物肽链合成的起始过程如下：

1. 核糖体大、小亚基分离　起始因子 eIF-2B、eIF-3 与核糖体小亚基结合，在 eIF-6

参与下，促进 80S 核糖体解离成大、小亚基。

2. Met-tRNAi^{Met} 与核糖体小亚基结合　在 eIF-2B 的作用下，eIF-2 与 GTP 结合；在其他 eIF 的参与下，Met-tRNAi^{Met} 与结合了 GTP 的 eIF-2 共同结合于小亚基的 P 位。

3. mRNA 在核糖体小亚基就位　真核 mRNA 不含 S-D 序列，其在核糖体小亚基上的定位依赖于由多种蛋白质因子组成的帽子结合蛋白复合物（eIF-4F 复合物）。eIF-4F 复合物包括 eIF-4E、eIF-4G、eIF-4A 各组分，它通过 eIF-4E 结合 mRNA 5′-帽子。poly A 结



●图 12-11　真核生物肽链合成的起始

合蛋白（poly A binding protein，PAB 或 PABP）可结合 mRNA 的 3′-poly A 尾。结合了帽子的 eIF-4E 和结合了 poly A 的 PAB 通过 eIF-4G 和 eIF-3 与核糖体小亚基结合成复合物。eIF-4A 具有 RNA 解螺旋酶活性，与 eIF-4E 形成复合物后定位于 mRNA 起始密码子 AUG 上游的引导区。在 eIF-4B 的作用下，eIF-4A 通过消耗 ATP 将 mRNA 引导区的二级结构解链，以利于 Met-tRNAi^{Met} 以 5′→3′的方向沿 mRNA 进行扫描，直到起始 AUG 与 Met-tRNAi^{Met} 的反密码子配对结合，使 mRNA 最终在小亚基准确定位。

4. 核糖体大亚基结合 已经结合 mRNA、Met-tRNAi^{Met} 的小亚基迅速与 60S 大亚基结合，形成翻译起始复合物。同时，通过 eIF-5 作用和水解 GTP 供能，促进各种 eIF 从核糖体释放（图 12-11）。

（二）延长

真核生物肽链延长过程和原核生物基本相似，只是反应体系和延长因子不同。另外，真核细胞核糖体没有 E 位，转位时卸载的 tRNA 直接从 P 位脱落。

（三）终止

真核生物翻译终止过程与原核生物相似，但只有 1 种释放因子 eRF，可识别所有终止密码子，完成原核生物各类 RF 的功能。

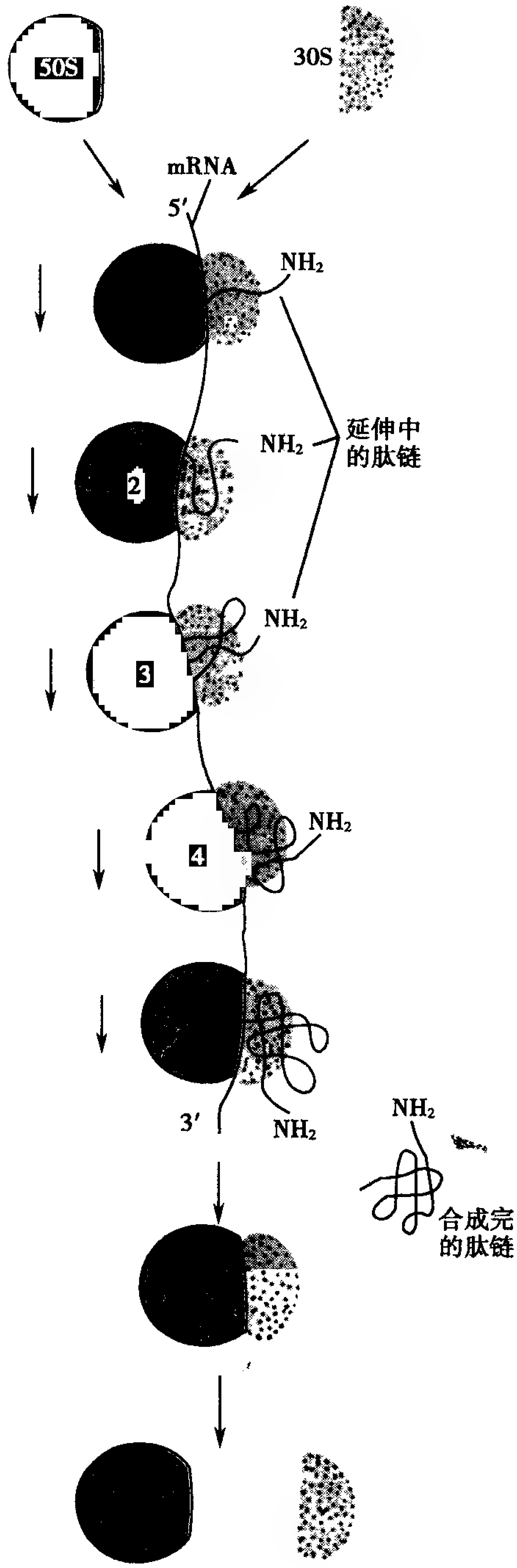
真核生物与原核生物肽链合成的主要步骤相同，但其过程具有许多差别（表 12-5）。

表 12-5 原核生物与真核生物肽链合成过程的主要差别

	原核生物	真核生物
mRNA	• 一条 mRNA 编码几种蛋白质（多顺反子）	• 一条 mRNA 编码一种蛋白质（单顺反子）
	• 转录后很少加工	• 转录后进行首、尾修饰及剪接
	• 转录、翻译和 mRNA 的降解可同时发生	• mRNA 在核内合成，加工后进入胞液，再作为模板指导翻译
核糖体	• 30S 小亚基＋50S 大亚基↔70S 核糖体	• 40S 小亚基＋60S 大亚基↔80S 核糖体
起始阶段	• 起始氨基酰-tRNA 为 fMet tRNA^{fMet}	• 起始氨基酰 tRNA 为 Met-tRNAi^{Met}
	• 核糖体小亚基先与 mRNA 结合，再与 fMet-tRNA^{fMet} 结合	• 核糖体小亚基先与 Met-tRNAi^{Met} 结合，再与 mRNA 结合
	• mRNA 的 S-D 序列与 16S rRNA3′-端的一段互补序列结合	• mRNA 的帽子结构与帽子结合蛋白复合物结合
	• 有 3 种 IF 参与起始复合物的形成	• 有至少 10 种 eIF 参与起始复合物的形成
延长阶段	• 延长因子为 EF-Tu、EF-Ts 和 EF-G	• 延长因子为 eEF-1α、eEF-1βγ 和 eEF-2
终止阶段	• 释放因子为 RF-1、RF-2 和 RF-3	• 释放因子为 eRF

无论在原核细胞还是真核细胞内，1 条 mRNA 模板链都可附着 10～100 个核糖体，这些核糖体依次结合起始密码子并沿 5′→3′方向读码移动，同时进行肽链合成，这种 mRNA 与多个核糖体形成的聚合物称为多聚核糖体（polysome）（图 12-12）。多聚核糖体的形成可以使蛋白质生物合成以高速度、高效率进行。

蛋白质生物合成是耗能过程，延长时每个氨基酸活化为氨基酰-tRNA 消耗 2 个高能键，进位、转位各消耗 1 个高能键。为保持蛋白质生物合成的高度保真性，任何步骤出现不正确连接都需消耗能量而水解清除，因此每增加 1 个肽键平均需要消耗由 GTP 或 ATP 提供的 5 个高能磷酸键。可以认为蛋白质是包含遗传信息的多聚分子，部分能量用于从 mRNA 信息到有功能蛋白质的翻译的保真性上。这使多肽链以高速度合成但出错率低于 10^{-4}。



●图 12-12　多聚核糖体

第四节　蛋白质翻译后修饰和靶向输送

新生多肽链不具备蛋白质的生物学活性，必须经过复杂的加工过程才能转变为具有天然构象的功能蛋白质，这一加工过程称为翻译后修饰（posttranslational modification）。翻译后修饰包括多肽链折叠为天然的三维构象及对肽链一级结构的修饰、空间结构的修饰

等。翻译后修饰在肽链合成开始即随之进行。尽管蛋白质生物合成中遗传密码只指导20种氨基酸的掺入，但结构分析表明，成熟蛋白质分子中存在100多种氨基酸，其中大部分氨基酸都是在20种编码氨基酸的基础上衍生出来的。由此可知，翻译后修饰使得蛋白质组成更加多样化，从而使蛋白质结构上呈现更大的复杂性。蛋白质在胞液的核糖体合成后还需要定向输送到合适的部位才能行使各自的生物学功能。在新合成的蛋白质中，有的驻留于细胞液，有的被运输到细胞器或镶嵌入细胞膜，还有的被分泌到细胞外并通过体液输送到其发挥作用的靶细胞。蛋白质合成后被定向输送到其发挥作用的靶位点的过程称为蛋白质的靶向输送（protein targeting）。

一、多肽链折叠为天然构象的蛋白质

新生的多肽链需要被逐步折叠成正确的天然空间构象才能成为有功能的蛋白质。完成多肽链折叠所需的所有信息都包含在蛋白质自身的氨基酸排列顺序中，即一级结构是空间构象的基础。新生肽链的折叠在肽链合成中、合成后完成，可能随着肽链的不断延伸而逐步折叠，产生正确的二级结构、模体、结构域到形成完整空间构象。

虽然线性多肽链折叠成天然空间构象是一个释放自由能的自发过程，但由于新生肽链的N-端在核糖体上一出现即开始折叠，而这时肽链的下游部分尚未合成，已合成的这一部分肽段因缺乏完整性而可能形成不正确的折叠。另外，一条尚未完全合成的多肽链有可能与其他核糖体上正在合成的多肽链之间相互作用，从而聚集在一起，引起新生肽链的折叠混乱。这种结构混乱的多肽链集合体对细胞有致命的影响。实际上，细胞中大多数天然蛋白质折叠都不是自动完成的，其折叠过程需要其他酶或蛋白质的辅助。这些辅助性蛋白质可以指导新生蛋白质按特定方式进行正确的折叠。下面讨论几种具有促进蛋白质折叠功能的大分子。

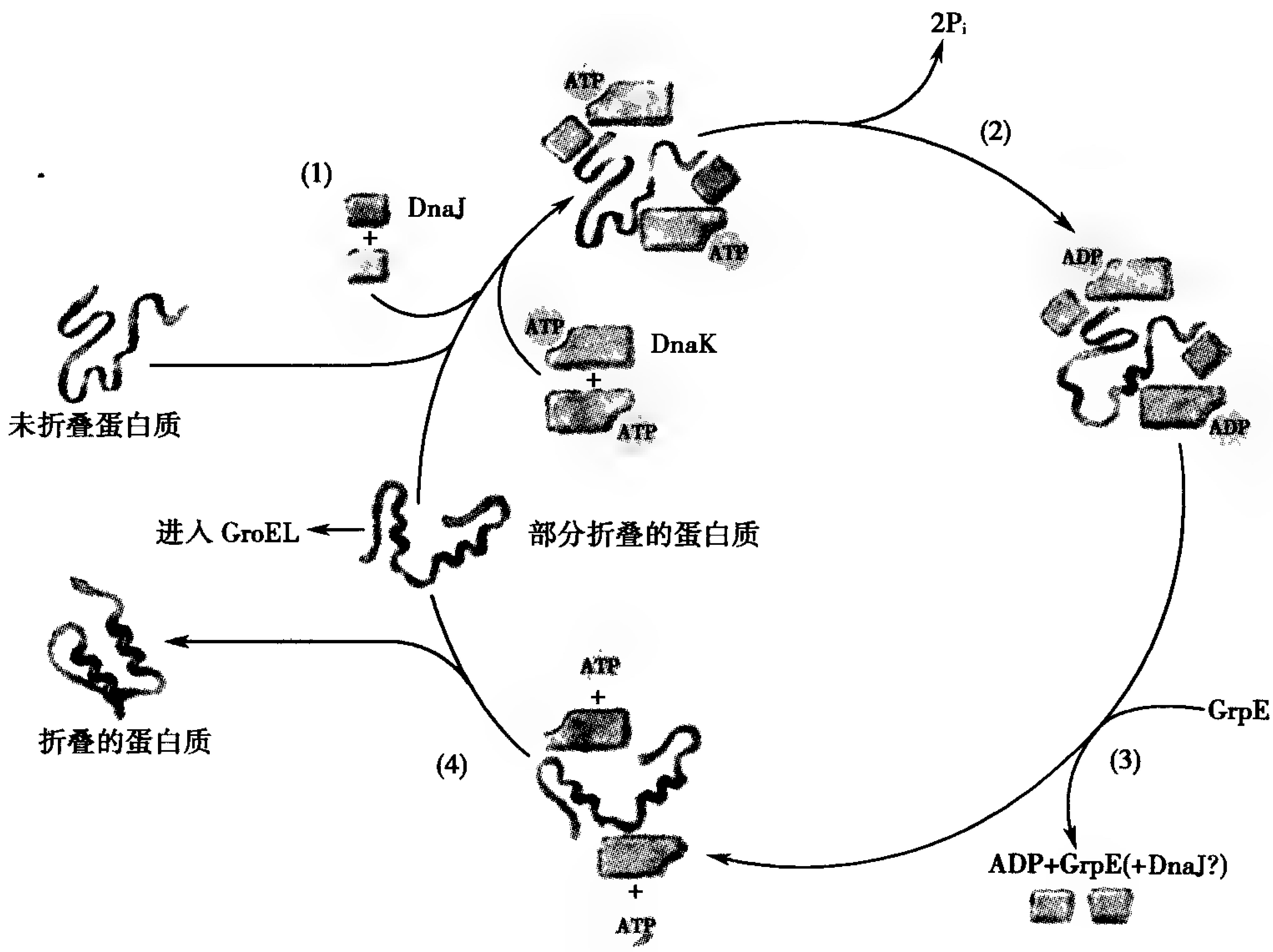
1. 分子伴侣（molecular chaperon） 分子伴侣是细胞内一类可识别肽链的非天然构象、促进各功能域和整体蛋白质正确折叠的保守蛋白质。分子伴侣有以下功能：①封闭待折叠蛋白质暴露的疏水区段；②创建一个隔离的环境，可以使蛋白质的折叠互不干扰；③促进蛋白质折叠和去聚集；④遇到应激刺激，使已折叠的蛋白质去折叠。细胞内分子伴侣可分为两大类，一类为核糖体结合性分子伴侣，包括触发因子（trigger factor，TF）和新生链相关复合物（nascent chain-associated complex，NAC）；另一类为非核糖体结合性分子伴侣，包括热休克蛋白、伴侣蛋白等。以下介绍非核糖体结合性分子伴侣。

（1）热休克蛋白（heat shock protein，HSP）：热休克蛋白属于应激反应性蛋白质，高温应激可诱导该蛋白质合成。大肠杆菌中参与蛋白质折叠的热休克蛋白包括HSP70、HSP40和Grp E三族，各种生物都有相应同源蛋白质。在蛋白质翻译后修饰过程中，这些热休克蛋白可促进需要折叠的多肽链折叠为有天然空间构象的蛋白质。

目前，人们对真核细胞内蛋白质的折叠过程还知之甚少，有关蛋白质折叠的知识主要来自对大肠杆菌中蛋白质折叠的研究。大肠杆菌中，HSP70由基因*dna K*编码，故HSP70又被称为Dna K。它有两个主要功能域：一个是存在于N-端的高度保守的ATP酶结构域，能结合和水解ATP；另一个是存在于C-端的多肽链结合结构域。蛋白质的折叠需要这两个结构域的相互作用。在蛋白质的折叠过程中，HSP70还需要2个辅助因子HSP40和Grp E。大肠杆菌的HSP40为Dna J，在ATP存在的情况下，Dna J和Dna K的相互作用能抑制蛋白质的聚集；Grp E作为核苷酸交换因子与HSP40作用，通过改变Dna K的构象而控制Dna K的ATP酶活性。

热休克蛋白促进蛋白质折叠的基本过程是HSP70反应循环，其具体步骤如图12-13

所示：在大肠杆菌中，Dna J 首先与未折叠或部分折叠的多肽链结合，将多肽导向 Dna K-ATP 复合物，并与 Dna K 结合。Dna J 激活 Dna K 的 ATP 酶，使其水解 ATP 生成 ADP，产生稳定的 Dna J-Dna K-ADP-多肽复合物。在 Grp E 的作用下，ATP 与复合物中的 ADP 交换，使复合物变为不稳定而迅速解离，释放出被完全折叠或完成部分折叠的蛋白质，其中尚未完成折叠的蛋白质既可进入新一轮 HSP70 反应循环，又可进入 Gro EL 反应循环，最后完成折叠过程。



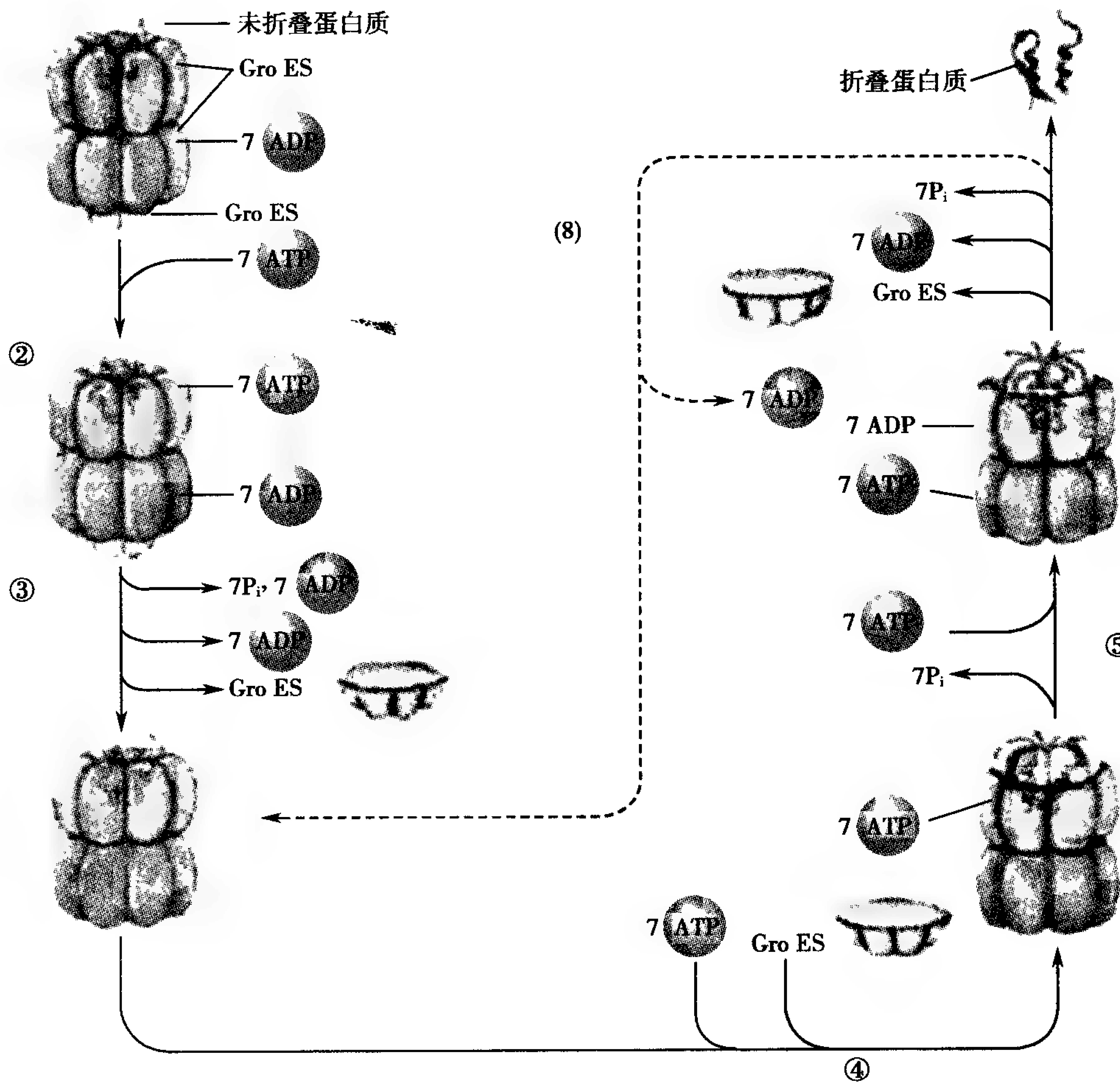
● 图 12-13　大肠杆菌中的 HSP70 反应循环

人类细胞中 HSP 蛋白质家族可存在于胞质、内质网腔、线粒体、胞核等部位，涉及多种细胞保护功能：如使线粒体和内质网蛋白质保持未折叠状态而转运、跨膜，再折叠成功能构象；通过类似上述机制，避免或消除蛋白质变性后因疏水基团暴露而发生的不可逆聚集，以利于清除变性或错误折叠的多肽中间物等。

（2）伴侣蛋白（chaperonin）：伴侣蛋白是分子伴侣的另一家族，如大肠杆菌的 Gro EL 和 Gro ES（真核细胞中同源物为 HSP60 和 HSP10）等家族，其主要作用是为非自发性折叠蛋白质提供能折叠形成天然空间构象的微环境。估计大肠杆菌细胞中约 10%～20% 的蛋白质折叠需要这一家族成员的辅助。

Gro EL 是由 14 个相同亚基组成的多聚体，每 7 个亚基围成一圈，上下两圈堆砌形成桶状空腔，组成未封闭的复合体，顶部是空腔的出口。Gro ES 是由 7 个相同的亚基组成的圆顶状蛋白质，可与 Gro EL 一起形成 Gro EL-Gro ES 复合物。当待折叠肽链进入 Gro EL 的桶状空腔后，Gro ES 可作为“盖子”瞬时封闭 Gro EL 的出口，封闭后的桶状空腔提供了能完成该肽链折叠的微环境。图 12-14 显示 Gro EL-Gro ES 反应循环：①待折叠的肽链进入由 Gro ES 复合体封闭了底部出口的 Gro EL 复合体的上半部分空腔；②7 个 ATP 分子与 Gro EL 上半部分的亚基结合（Gro EL 下半部分的亚基已结合 7 个 ADP 分子）；③随着 ATP 的水解，14 个 ADP、7 个无机磷酸及 Gro ES 释放；④7 个 ATP 及 Gro

ES与Gro EL上半部分的亚基（其空腔内含有待折叠肽链）结合，封闭Gro EL空腔的上部出口；⑤ATP水解生成ADP和无机磷酸，ADP仍留在Gro EL复合体上，无机磷酸释放，同时另7个ATP与Gro EL下半部分的亚基（其空腔中无待折叠肽链）结合；⑥肽链在密闭的Gro EL空腔内折叠，此时Gro EL的顶部结构进行大幅度转动和向上移动，导致空腔扩大，使其表面由疏水状态转变为亲水状态，促进肽链的折叠；⑦折叠过程完成后，形成天然空间构象的蛋白质被释放，而尚未完成折叠的蛋白质可再进入下一轮循环。重复以上过程，直到形成天然空间构象。



●图12-14　Gro EL-Gro ES反应循环

实际上，分子伴侣并未加快折叠反应速度，只是通过消除不正确折叠，增加功能性蛋白质折叠产率而促进天然蛋白质折叠。

2. 蛋白质二硫键异构酶（protein disulfide isomerase，PDI）　多肽链内或肽链之间二硫键的正确形成对稳定分泌型蛋白质、膜蛋白质等的天然构象十分重要，这一过程主要在细胞内质网进行。多肽链的几个半胱氨酸间可能出现错配二硫键，影响蛋白质正确折叠。二硫键异构酶在内质网腔活性很高，可在较大区段肽链中催化错配的二硫键断裂并形成正确的二硫键连接。最终使蛋白质形成热力学最稳定的天然构象。

3. 肽-脯氨酰顺反异构酶（peptide prolyl-cis-trans isomerase，PPI）　脯氨酸为亚氨基酸，多肽链中肽酰-脯氨酸间形成的肽键有顺反两种异构体，其空间构象有明显差别。肽

酰-脯氨酰顺反异构酶可促进上述顺反两种异构体之间的转换。天然蛋白质肽链中肽酰-脯氨酸间的肽键绝大部分是反式构型，仅6%为顺式构型。肽酰-脯氨酰顺反异构酶是蛋白质三维构象形成的限速酶，在肽链合成需形成顺式构型时，可使多肽链在各脯氨酸弯折处形成准确折叠。

二、蛋白质一级结构修饰主要是肽键水解和化学修饰

（一）肽链N-端和C-端有切除和（或）化学修饰

翻译过程中，新生肽链的第一个氨基酸总是N-甲酰甲硫氨酸（原核生物）或甲硫氨酸（真核生物），但多数天然蛋白质不以N-甲酰甲硫氨酸或甲硫氨酸为N-端第一位氨基酸。细胞内脱甲酰基酶或氨基肽酶可以除去N-甲酰基、N-端甲硫氨酸或N-端附加序列（如信号肽）；真核生物中，约50%的蛋白质有N-端氨基酸的乙酰化；在肽链合成过程中可发生N-端修饰。C-端的氨基酸残基有时也出现修饰现象。

（二）各种氨基酸残基可进行多种化学修饰

蛋白质分子中某些氨基酸残基的侧链存在着共价结合的化学基团，是翻译后经特异加工形成的。由于这些共价修饰，组成蛋白质的氨基酸种类显著增加。据估计，蛋白质中有100多种修饰性氨基酸。这些修饰性氨基酸对蛋白质的生物学功能的发挥至关重要。

1. 糖基化　多肽链中某些天冬酰胺残基的酰胺氮、丝氨酸或苏氨酸残基的羟基可以与寡糖链以共价键连接而使多肽链糖基化，并行使多种生物学功能。

2. 羟基化　胶原蛋白前体的赖氨酸、脯氨酸残基羟基化是成熟胶原形成链间共价交联结构的基础。此外，乙酰胆碱酯酶和补体中也存在羟脯氨酸。

3. 甲基化　某些原核生物（如大肠杆菌）具有甲基转移酶，可将膜结合性化学受体的谷氨酸残基甲基化，从而调节原核生物的化学趋化性。在真核生物中，蛋白质的甲基化有多方面的作用，如组蛋白的精氨酸残基可被甲基化修饰而影响染色质的精细结构，进而参与基因表达的调节；某些受损蛋白质分子中的天冬氨酸可被甲基化，从而促进蛋白质的修复或降解；某些异种蛋白质（disparate protein）如2,3-二磷酸核酮糖羧化酶、钙调蛋白、组蛋白、细胞色素c等，其分子中的赖氨酸残基甲基化可改变蛋白质的功能。

4. 磷酸化　细胞内信号分子的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基的磷酸化介导细胞信号转导。代谢途径中的某些酶蛋白通过酪氨酸残基的磷酸化与去磷酸化来改变酶的活性，从而调节其代谢水平。某些蛋白质分子中特定的酪氨酸残基的磷酸化是正常细胞向恶性细胞转化的重要步骤。

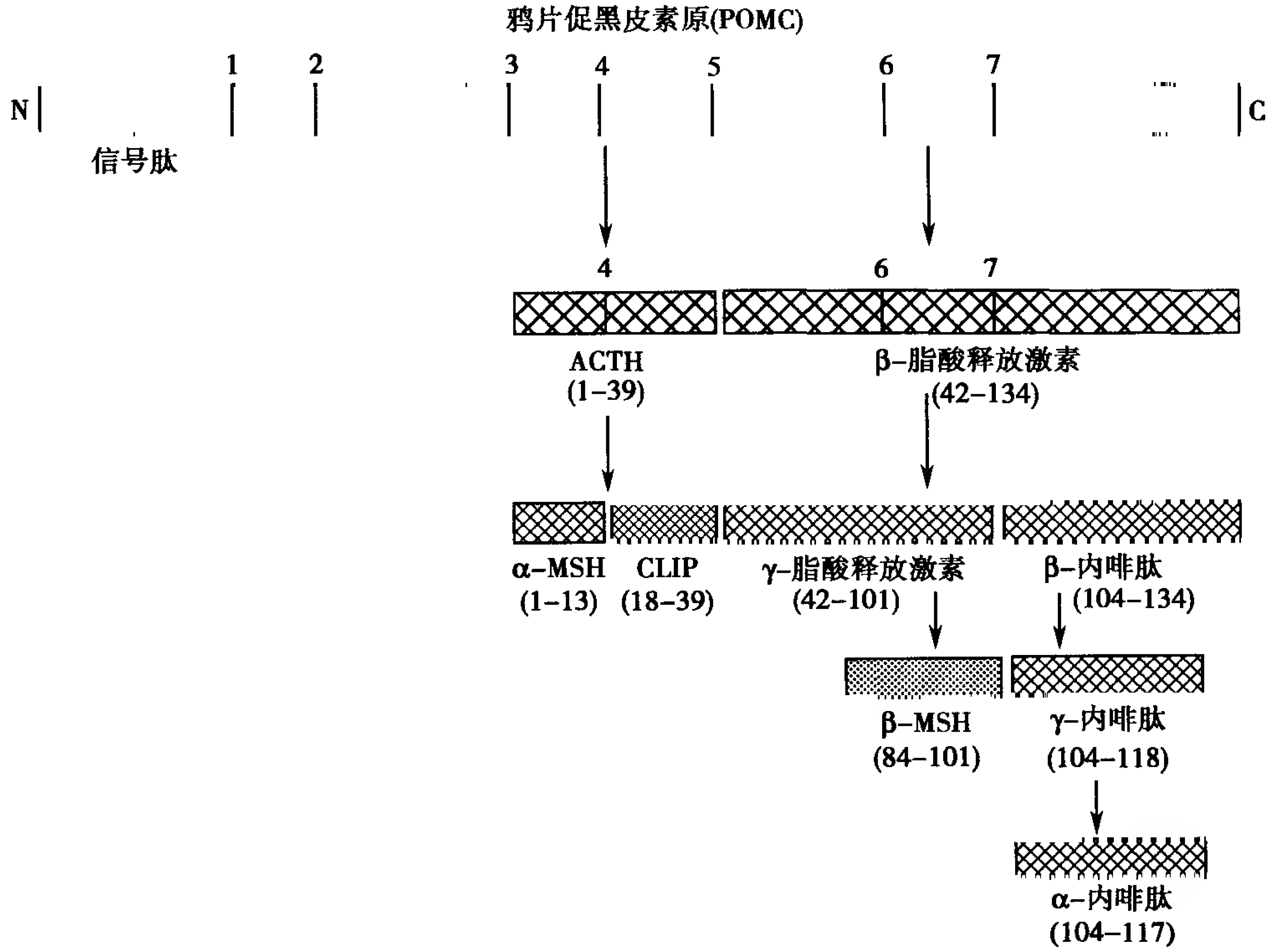
5. 二硫键形成　某些分泌型蛋白质常常形成链内二硫键，以维系和稳定蛋白质的天然构象，从而避免受环境因素影响而变性。

6. 亲脂性修饰　某些蛋白质在翻译后需要在肽链特定位点共价连接一个或多个疏水性脂链，包括脂肪酸链、多异戊二烯链等，以增强它们与膜系统的结合能力，或增进蛋白质-蛋白质间的相互作用。如Ras蛋白、G蛋白等，这些蛋白质通过脂链嵌入疏水膜脂双层，定位成为特殊质膜内在蛋白，才能成为具有特定生物学功能的蛋白质；再如某些G蛋白的α亚基在其N-端的甘氨酸残基连接豆蔻酸后，与膜上该蛋白质的β-亚基及γ-亚基的亲和力增强。

（三）水解加工可生成具有生物活性的蛋白质或多肽

某些无活性的蛋白质前体可经蛋白酶水解，生成具有活性的蛋白质或多肽，如胰岛素原被酶解而生成胰岛素，多种蛋白酶原经裂解激活成蛋白酶。另外，真核细胞某些大分子

多肽前体，经翻译后加工，水解生成数种小分子活性肽类。如由 256 个氨基酸残基组成的鸦片促黑皮质素原（pro-opio-melano-cortin，POMC），可被水解生成促肾上腺皮质激素（adrenocorticotropic hormone，ACTH）、β-脂酸释放激素（β-lipotropin，β-LT）、α-促黑激素（α-melanocyte stimulating hormone，α-MSH）、促肾上腺皮质激素样中叶肽（corticotropin-like intermediate lobe peptide，CLIP）、γ-脂酸释放激素（γ-LT）、β-内啡肽（β-endorphin）、β-促黑激素（β-MSH）、γ-内啡肽（γ-endorphin）及 α-内啡肽（α-endorphin）等活性物质（图 12-15）。



● 图 12-15　POMC 的水解修饰

POMC 的水解位点由 Arg-Lys、Lys-Arg 或 Lys-Lys 序列构成，用数字 1～7 表示。各活性物质下方括号内的数字为其在 POMC 中对应的氨基酸编号（将 ACTH 的 N-端第一位氨基酸残基编为 1 号）

三、蛋白质空间结构修饰包括亚基聚合和辅基连接

多肽链合成后，除了正确折叠成天然空间构象外，还需要经过某些其他的空间结构的修饰，才能成为有完整天然构象和全部生物学功能的蛋白质。

（一）通过非共价键亚基聚合形成具有四级结构的蛋白质

具有四级结构的蛋白质由两条以上的肽链通过非共价键聚合，形成寡聚体（oligomer），使蛋白质亚基相互聚合的信息蕴藏在肽链的氨基酸序列中。例如成人型血红蛋白分子 $\alpha_2\beta_2$ 亚基的聚合。质膜镶嵌蛋白、跨膜蛋白质也多为寡聚体，虽然各亚基各有独立功能，但又必须互相依存，才能发挥其生物学作用。

（二）辅基连接后形成完整的结合蛋白质

蛋白质分为单纯蛋白质和结合蛋白质两类。各种结合蛋白质如脂蛋白、色蛋白及各种

带辅基的酶，合成后都需要结合相应辅基，才能成为具有功能活性的天然蛋白质。辅基（辅酶）与肽链的结合过程十分复杂。

四、合成后蛋白质可被靶向输送至细胞特定部位

蛋白质在核糖体上合成后，必须被分选出来，定向输送到一个合适的部位才能行使其生物学功能，大致有三种去向：①保留在细胞液；②进入细胞器；③分泌到细胞外。驻留在细胞液中的蛋白质在游离核糖体上合成后，释放到细胞液即可行使其功能，而运往其他部位的蛋白质都必须先通过膜性结构，经过复杂的靶向输送机制后才能到达目的地。蛋白质的靶向输送与翻译后修饰过程同步进行。

（一）靶向输送的蛋白质 N-端存在信号序列

所有靶向输送的蛋白质结构中都存在分选信号，主要是 N-端特异氨基酸序列，可引导蛋白质转移到细胞的适当靶部位，这类序列称为信号序列（signal sequence）。信号序列是决定蛋白质靶向输送特性的最重要元件，提示指导蛋白质靶向输送的信息存在于蛋白质的一级结构中。

靶向不同的蛋白质各有特异的信号序列或成分。多数靶向输送到溶酶体、质膜或分泌到细胞外的蛋白质，其肽链的 N-端有一长度为 13～36 个氨基酸残基的信号序列称为信号肽（signal peptide）。信号肽具有以下共性：①N-端有带正电荷的碱性氨基酸残基，如赖氨酸、精氨酸；②中段为疏水核心区，主要含疏水的中性氨基酸，如亮氨酸、异亮氨酸等；③C-端加工区由一些极性相对较大、侧链较短的氨基酸（如甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸）组成，紧接着是被信号肽酶（signal peptidase）裂解的位点（图 12-16）。所有靶向输送到细胞核的蛋白质其多肽链内含有特异信号序列，称为核定位序列（nuclear localization sequence，NLS）。NLS 是含 4～8 个氨基酸残基的短序列，富含带正电荷的赖氨酸、精氨酸和脯氨酸，可位于肽链的不同部位。不同的 NLS 间未发现共有序列，NLS 在蛋白质进核定位后不被切除。

		信号肽酶裂解位点
人生长激素	M A T G S R T S L L L A F G L L C L P W L Q E G S A	F P T
人胰岛素原	M A L W M R L L P L L A L L A L W G P D P A A A	F V N
牛血清蛋白原	M K W V T F I S L L L F S S A Y S	R G V
果蝇胶蛋白	M K L L V V A V I A C M L I G F A D P A S G	C K D

●图 12-16　某些真核细胞分泌型蛋白质的信号序列

带阴影的字母为碱性氨基酸残基，带下划线的字母为疏水性氨基酸残基

信号肽的发现

美国科学家 G. Blobel 和 D. Sabatini 于 1970 年提出了蛋白质的“信号假说”，首次阐述了信号肽的作用，认为蛋白质具有内在的信号分子，能够调节蛋白质在细胞内的转运和定位。Blobel 由此荣获 1999 年度诺贝尔生理医学奖。

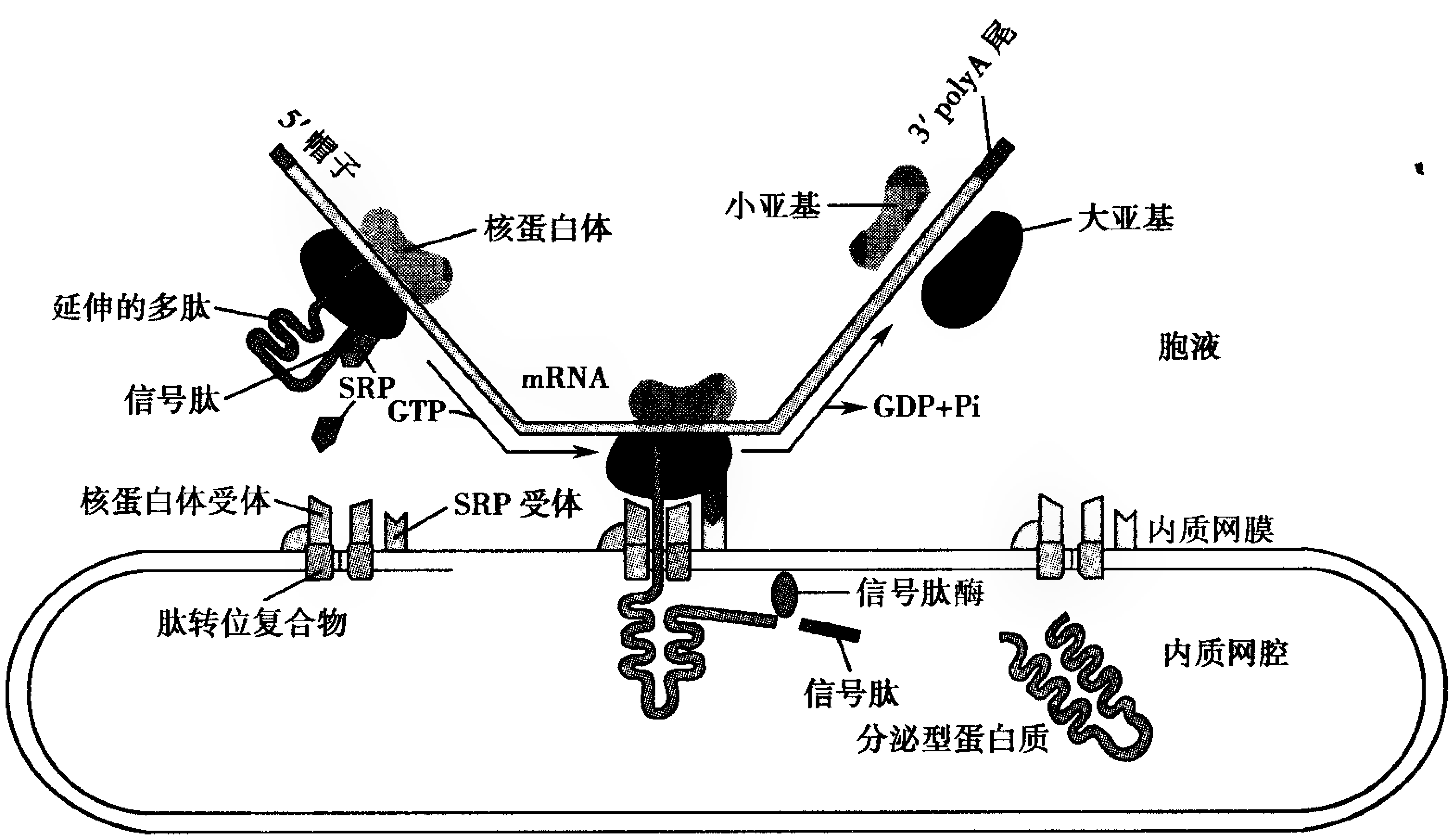
（二）分泌型蛋白质由分泌小泡靶向输送至胞外

真核细胞分泌型蛋白质的靶向输送过程为：核糖体上合成的肽链先由信号肽引导进入

内质网腔并被折叠成为具有一定功能构象的蛋白质，在高尔基复合体中被包装进分泌小泡，转移至细胞膜，再分泌到细胞外。

分泌型蛋白质靶向进入内质网，需要多种蛋白质成分的协同作用。例如，①真核细胞胞液内存在信号肽识别颗粒（signal recognition particle，SRP），是由 6 个多肽亚基和 1 分子 7S RNA 组成的复合体，SRP 可结合 GTP，有 GTP 酶活性；②内质网膜上存在一种被称为 SRP 受体的膜蛋白，因可结合 SRP 又被称为 SRP 对接蛋白（docking protein，DP）。DP 由 α-亚基和 β-亚基构成，其中 α-亚基可结合 GTP，有 GTP 酶活性；③核糖体受体也为内质网膜蛋白，可结合核糖体大亚基使其与内质网膜稳定结合；④肽转位复合物（peptide translocation complex）为多亚基跨内质网膜蛋白，可形成新生肽链跨内质网膜的蛋白质通道。

分泌型蛋白质进入内质网的过程如图 12-17 所示：①指导合成分泌型蛋白质的 mRNA 首先与胞质中的游离核糖体结合，开始合成该蛋白质的信号肽；②当信号肽从核糖体内延伸出来后，SRP 即与新生的信号肽、GTP 以及核糖体结合，形成核糖体-多肽-SRP 复合物。当肽链延伸到约 70 个氨基酸残基的长度时，信号肽完全移出核糖体。由于这时 SRP 结合了信号肽和核糖体，多肽链合成暂停；③在 SRP 的引导下，核糖体-多肽-SRP 复合物识别并结合内质网膜上与 GTP 结合的 SRP 受体；④GTP 水解，使 SRP 脱离信号肽及核糖体，多肽链继续延长；⑤核糖体大亚基与核糖体受体结合，锚定在内质网膜上，使滑面内质网变成带有核糖体的粗面内质网；⑥水解 GTP 供能，诱导肽转位复合物开放跨内质网膜蛋白质通道，新生蛋白质信号肽插入内质网膜；⑦信号肽启动肽链转位，延长中的多肽链直接经核糖体及跨内质网膜蛋白质通道而进入内质网腔；⑧信号肽被内质网腔信号肽酶切除并迅速降解；⑨内质网腔的 HSP70 经消耗 ATP 而促进多肽链折叠成功能构象；留于内质网膜外的核糖体等各种成分解聚后再循环。

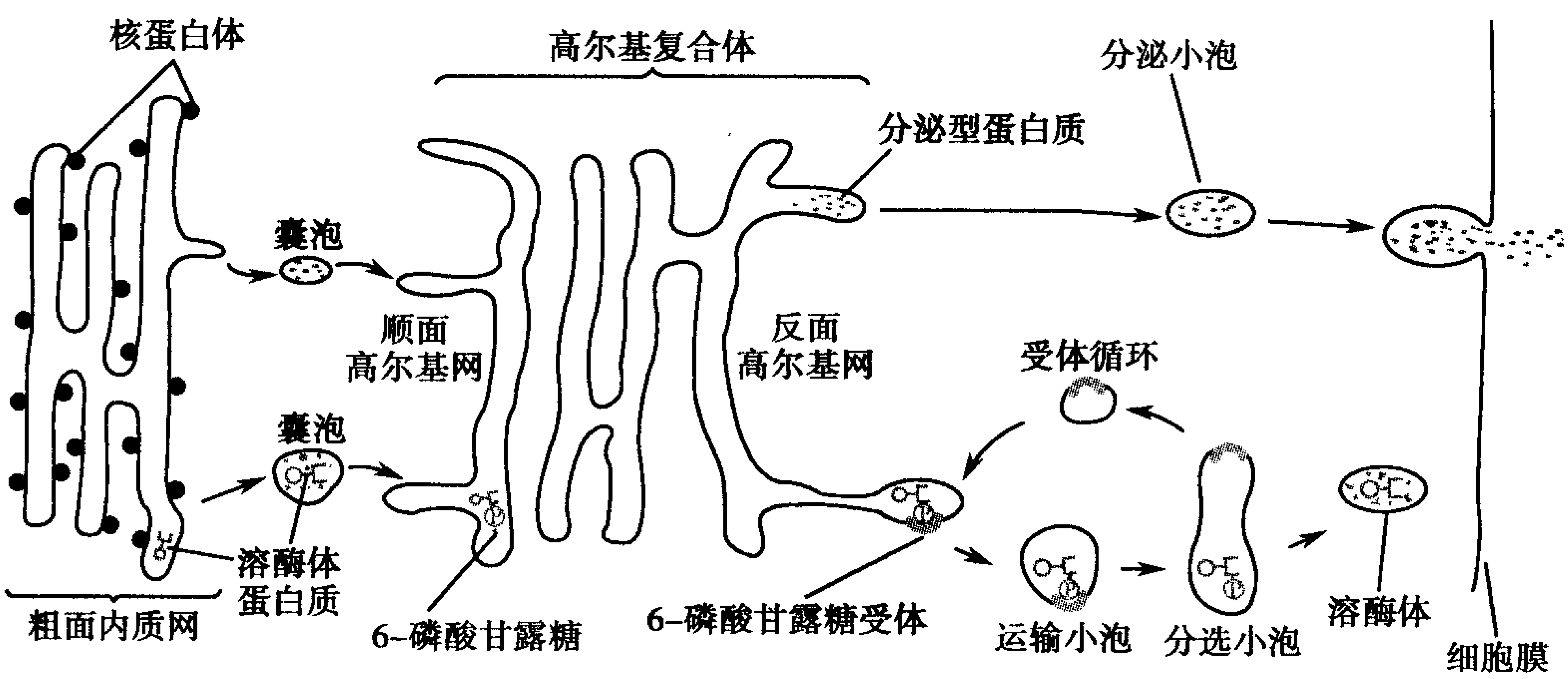


●图 12-17　信号肽引导真核细胞分泌型蛋白质进入内质网

分泌型蛋白质在内质网腔内完成折叠后，随内质网膜“出芽”形成的囊泡转移至高尔基复合体。囊泡与顺面高尔基网状结构融合，将分泌型蛋白质释放到高尔基中间膜囊进行糖基化修饰。糖基化后的分泌型蛋白质以分泌小泡的形式从反面高尔基网状结构转运至细胞膜，通过胞吐作用分泌到细胞外（图 12-18）。

（三）蛋白质6-磷酸甘露糖基化是靶向输送至溶酶体的信号

溶酶体蛋白质从合成到输送至高尔基复合体的过程与分泌型蛋白质的靶向输送过程相似。进入高尔基复合体后，溶酶体蛋白质被糖基化并与6-磷酸甘露糖结合，后者是引导溶酶体蛋白质输送至溶酶体的信号，能被反面高尔基网状结构上的6-磷酸甘露糖受体识别并结合。溶酶体蛋白质与6-磷酸甘露糖受体结合后，在反面高尔基网状结构上包装成运输小泡，并以"出芽"方式离开高尔基复合体。运输小泡与分选小泡融合，受分选小泡内酸性环境的影响，溶酶体蛋白质与受体解离，同时经磷酸酶作用而去除6-磷酸甘露糖上的磷酸基，以避免溶酶体蛋白质与其受体再度结合。含有受体的囊泡从分选小泡上"出芽"而离开分选小泡，将受体运回高尔基复合体而被再利用，溶酶体蛋白质则通过囊泡与溶酶体融合而被输送入溶酶体（图12-18）。



●图12-18　真核细胞分泌型蛋白质和溶酶体蛋白质的靶向输送

（四）靶向输送至内质网的蛋白质C-端含有滞留信号序列

内质网中含有很多能帮助新生蛋白质折叠成天然构型的蛋白质，如分子伴侣等。与分泌型蛋白质一样，内质网中的驻留蛋白质先经粗面内质网上附着的核糖体合成并进入内质网腔，然后随囊泡输送到高尔基复合体。但是，内质网蛋白质多肽链的C-端含有滞留信号序列（如多数脊椎动物细胞的滞留信号序列为Lys-Asp-Glu-Leu），可与相应受体结合。在高尔基复合体上，内质网蛋白质通过其滞留信号序列与受体结合后，随囊泡输送回内质网。

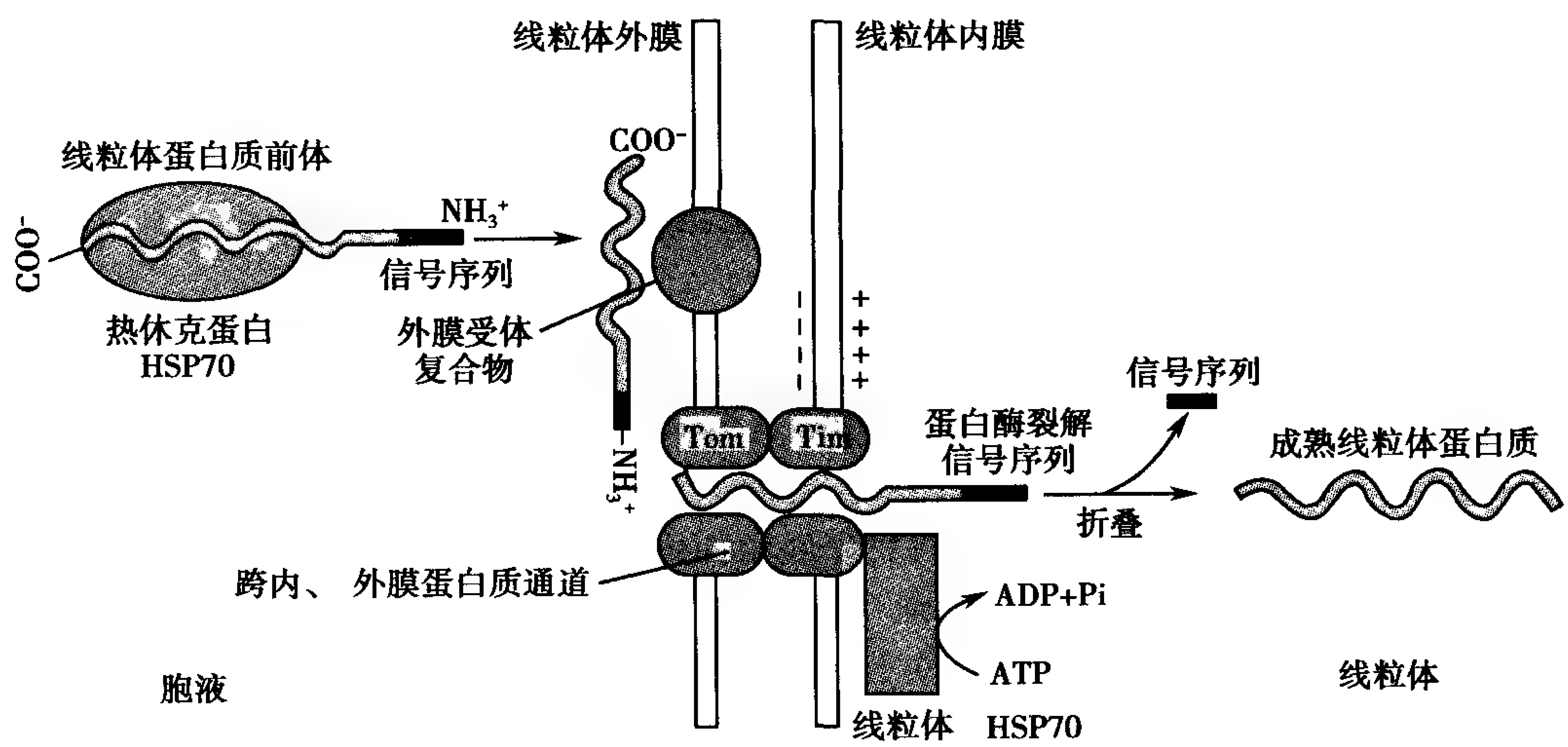
（五）质膜蛋白质的靶向输送由囊泡转移到细胞膜

质膜蛋白质合成时在粗面内质网上的跨膜机制与分泌型蛋白质的跨膜机制相似，但是质膜蛋白质的肽链并不完全进入内质网腔，而是锚定在内质网膜上。不同类型的跨膜蛋白质以不同的形式锚定于膜上。例如，单次跨膜蛋白质（single membrane-spanning protein）的肽链中除N-端的信号序列外，还有一段由疏水氨基酸残基构成的跨膜序列，即终止转移序列（stop transfer sequence），是跨膜蛋白质在膜上的嵌入区域。当合成中的肽链向内质网腔导入时，疏水的终止转移序列可与内质网膜的脂双层相互作用而结合在一起，从而使导入中的肽链不再向内质网腔内转移，形成一次跨膜的锚定蛋白质。多次跨膜蛋白质（multiple membrane-spanning protein）的肽链中因有多个终止转移序列或信号序列，可在内质网膜上形成多次跨膜。质膜蛋白质以上述跨膜形式通过内质网膜"出芽"而形成囊泡。随后，跨膜蛋白质随囊泡转移到高尔基复合体加工，再随囊泡转移到细胞膜。囊泡最终与细胞膜融合而构成新的质膜。

(六)线粒体蛋白质以其前体形式在胞液合成后靶向输入线粒体

线粒体虽然含有其自身的DNA、核糖体和mRNA,可以进行蛋白质的生物合成,但绝大部分线粒体蛋白质是由核基因组编码、在胞液中的游离核糖体上合成后释放、靶向输送到线粒体中的。

90%以上的线粒体蛋白质以其前体形式在胞液合成后输入线粒体,如氧化磷酸化相关蛋白质等,其中大部分蛋白质定位于基质,其他定位于内、外膜或膜间隙,其N-端都有相应信号序列。如线粒体基质蛋白质前体的N-端有保守的长度为20~35个氨基酸残基的信号序列,称为导肽,富含丝氨酸、苏氨酸及碱性氨基酸残基。线粒体基质蛋白质靶向输送过程如图12-19所示:①胞液新合成的线粒体蛋白质与分子伴侣HSP70或线粒体输入刺激因子(MSF)结合,以稳定的未折叠形式转运到线粒体;②蛋白质通过信号序列识别、结合线粒体外膜的受体复合物;③蛋白质被转运、穿过由线粒体外膜转运体(Tom)和内膜转运体(Tim)共同构成的跨内、外膜蛋白质通道,以未折叠形式进入线粒体基质,同时释放胞液HSP70;④基质HSP70水解ATP释放的能量与跨内膜电化学梯度为肽链进入线粒体提供动力;⑤蛋白质前体被蛋白酶切除其信号序列后,在上述的分子伴侣作用下折叠成有功能构象的蛋白质。输送到线粒体内膜和膜间隙的蛋白质除了上述导肽外,还含有另一个信号序列,其作用是引导蛋白质从基质输送到线粒体内膜或穿过内膜进入膜间隙。



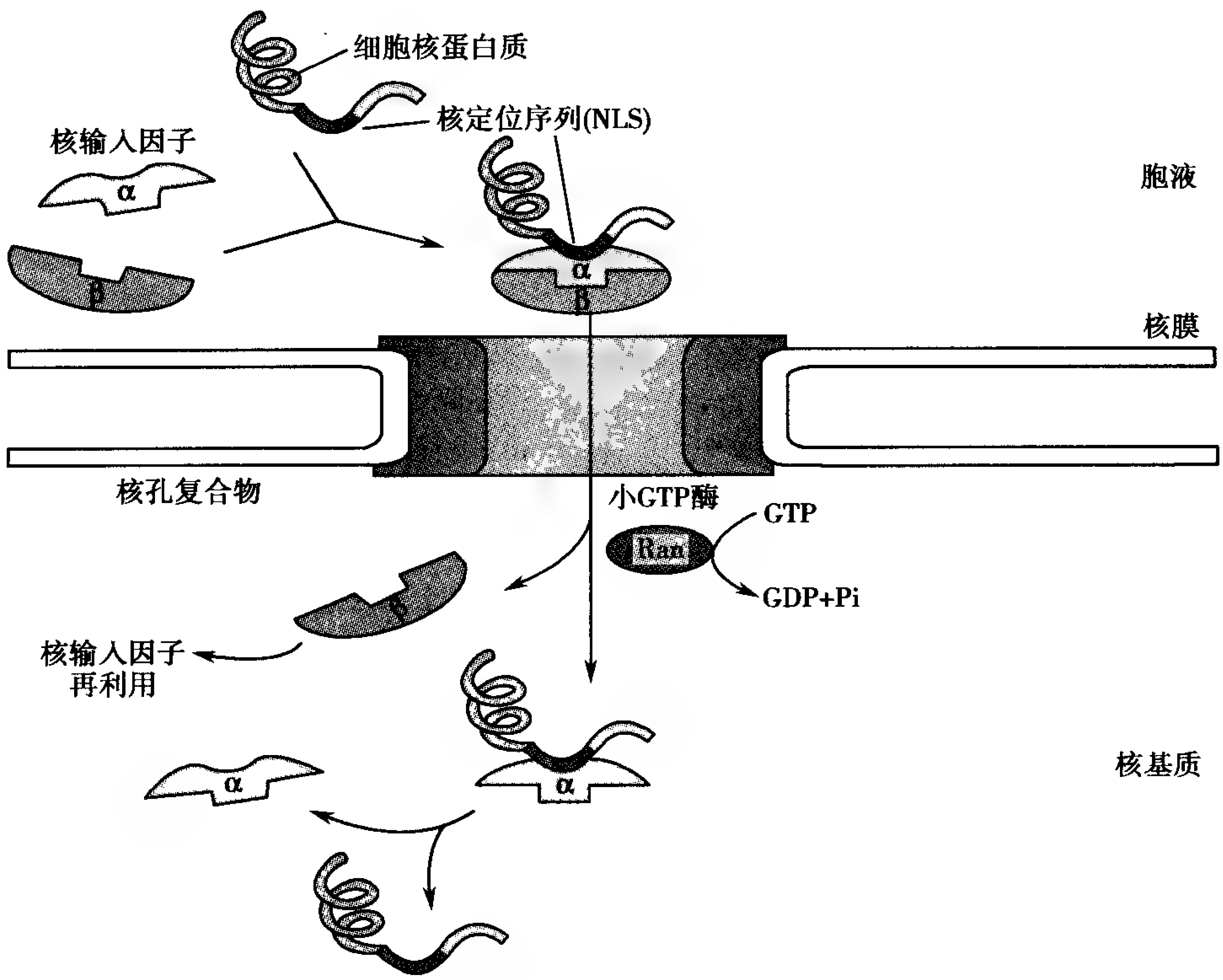
●图12-19 真核细胞线粒体蛋白质的靶向输送

(七)细胞核蛋白质在胞液中合成后经核孔靶向输送入核

细胞核内含有多种蛋白质,如参与复制、转录和基因表达调控的各种酶及蛋白质因子等。它们都是在胞液中合成之后通过核孔进入核内的。所有被靶向输送的细胞核蛋白质其多肽链内都含有特异的核定位序列(NLS)。NLS可位于肽链的不同部位,而且在该蛋白质完成核内定位后不被切除。NLS是由4~8个氨基酸残基组成的短序列,富含带正电荷的赖氨酸、精氨酸及脯氨酸。不同的NLS之间未发现共有序列。在真核细胞进行有丝分裂后的细胞核膜重建时,胞液中具有NLS的各种细胞核蛋白质可被重新靶向导入细胞核中。

细胞核蛋白质的靶向输送涉及几种蛋白质成分,包括核输入因子(nuclear importin)α和β,还有一种被称为Ran蛋白质的小GTP酶。输入因子αβ杂二聚体可作为细胞核蛋白质受体,识别结合NLS序列。靶向过程如图12-20所示:①胞液合成的细胞核蛋白质与输入因子αβ二聚体结合形成复合物,并被导向核膜的核孔;②由小GTP酶——Ran蛋白

质水解 GTP 释能，胞核蛋白质-输入因子复合物通过耗能机制跨核孔转位，进入核基质；③转位中，输入因子 β 和 α 先后从上述复合物中解离，移出核孔而被再利用，胞核蛋白质定位细胞核内，其信号序列（NLS）不被切除。



● 图 12-20　细胞核蛋白质的靶向输送

第五节　蛋白质生物合成的干扰和抑制

蛋白质生物合成是很多抗生素和某些毒素的作用靶点。抗生素等就是通过阻断真核、原核生物蛋白质合成体系中某组分的功能，干扰和抑制蛋白质生物合成过程而起作用的。真核、原核生物的翻译过程既相似又有差别，这些差别在临床医学中有重要价值。如抗生素能杀灭细菌但对真核细胞无明显影响，可以蛋白质生物合成所必需的关键组分作为研究新抗菌药物的作用靶点。某些毒素也作用于基因信息传递过程，对毒素作用原理的了解，不仅能研究其致病机制，还可从中发现寻找新药的途径。

下面讨论某些干扰和抑制翻译过程的抗生素或生物活性物质的作用及其机制。

一、许多抗生素通过抑制蛋白质生物合成发挥作用

抗生素（antibiotics）是一类由某些真菌、细菌等微生物产生的药物，可阻断细菌蛋白质合成而抑制细菌的生长和繁殖，对宿主无毒性的抗生素可用于预防和治疗人、动物和植物的感染性疾病。部分抗生素抑制蛋白质生物合成机制见表 12-6。

（一）影响翻译起始的抗生素

伊短菌素（edeine）和螺旋霉素（密旋霉素，pactamycin）引起 mRNA 在核糖体上错

位，从而阻碍翻译起始复合物的形成，对所有生物的蛋白质合成均有抑制作用。伊短菌素还可以影响起始 tRNA 的就位和 IF-3 的功能。

表 12-6　常用抗生素抑制蛋白质生物合成的原理与应用

抗生素	作用位点	作用原理	应用
伊短菌素	原核、真核核糖体小亚基	阻碍翻译起始复合物的形成	抗肿瘤药
四环素、土霉素	原核核糖体小亚基	抑制氨基酰-tRNA 与小亚基结合	抗菌药
链霉素、新霉素、巴龙霉素	原核核糖体小亚基	改变构象引起读码错误、抑制起始	抗菌药
氯霉素、林可霉素、红霉素	原核核糖体大亚基	抑制转肽酶、阻断肽链延长	抗菌药
嘌呤霉素	原核、真核核糖体	使肽酰基转移到它的氨基上后脱落	抗肿瘤药
放线菌酮	真核核糖体大亚基	抑制转肽酶、阻断肽链延长	医学研究
夫西地酸、细球菌素	EF-G	抑制 EF-G、阻止转位	抗菌药
大观霉素	原核核糖体小亚基	阻止转位	抗菌药

（二）影响翻译延长的抗生素

1. 干扰进位的抗生素　四环素（tetracycline）和土霉素（terramycin）特异性结合 30S 亚基的 A 位，抑制氨基酰-tRNA 的进位。粉霉素（pulvomycin）可降低 EF-Tu 的 GTP 酶活性，从而抑制 EF-Tu 与氨基酰-tRNA 结合；黄色霉素（kirromycin）阻止 EF-Tu 从核糖体释出；以上均导致核糖体停留在 mRNA 上，使核糖体循环停止。

2. 引起读码错误的抗生素　氨基糖苷（aminoglycoside）类抗生素能结合于 30S 亚基解码部位的附近区域，严重影响翻译的准确性。例如，巴龙霉素（paromomycin）诱导的构象改变能增强核糖体 A 位对近关联氨基酰-tRNA（near-cognate tRNA：其反密码子与 mRNA 的密码子结合时有一个碱基错配）的亲和力；链霉素（streptomycin）与 30S 小亚基结合，改变 A 位上氨基酰-tRNA 与其对应的密码子配对的精确性和效率，使氨基酰 tRNA 与 mRNA 错配；潮霉素 B（hygromycin B）和新霉素（neomycin）能与 16S rRNA 和 rpS12 结合，干扰 30S 亚基的解码部位，引起读码错误。这些抗生素均能使延长中的多肽链引入错误的氨基酸残基，改变细菌蛋白质合成的忠实性，从而使细菌蛋白质失活。

3. 影响肽键形成的抗生素　嘌呤霉素（puromycin）结构与酪氨酰-tRNA 相似，在翻译中可取代某些氨基酰-tRNA 而进入核糖体 A 位，但延长中的肽酰-嘌呤霉素容易从核糖体脱落，中断肽链合成；氯霉素（chloramphenicol）可结合核糖体 50S 亚基，阻止由转肽酶催化的肽酰基与氨基酰基之间的肽键形成；林可霉素（lincomycin）作用于核糖体 50S 大亚基上的 A 位和 P 位，阻止 tRNA 在这两个位置就位，抑制肽键形成。大环内酯类（macrolide）抗生素如红霉素（erythromycin）能与核糖体 50S 亚基中肽链排出通道结合，阻止新生肽链从核糖体大亚基中排出，从而阻止肽键的进一步形成；放线菌酮（cycloheximide）特异性抑制真核生物核糖体转肽酶的活性，因而通常只限于用做研究试剂。

4. 影响转位的抗生素　夫西地酸（fusidic acid）、硫链丝菌肽（thiostrepton）和细球菌素（micrococcin）抑制 EF-G 的酶活性，阻止核糖体循环中的转位过程。大观霉素（壮观霉素，spectinomycin）结合核糖体 30S 亚基，阻碍小亚基变构，从而抑制 EF-G 催化的转位反应。

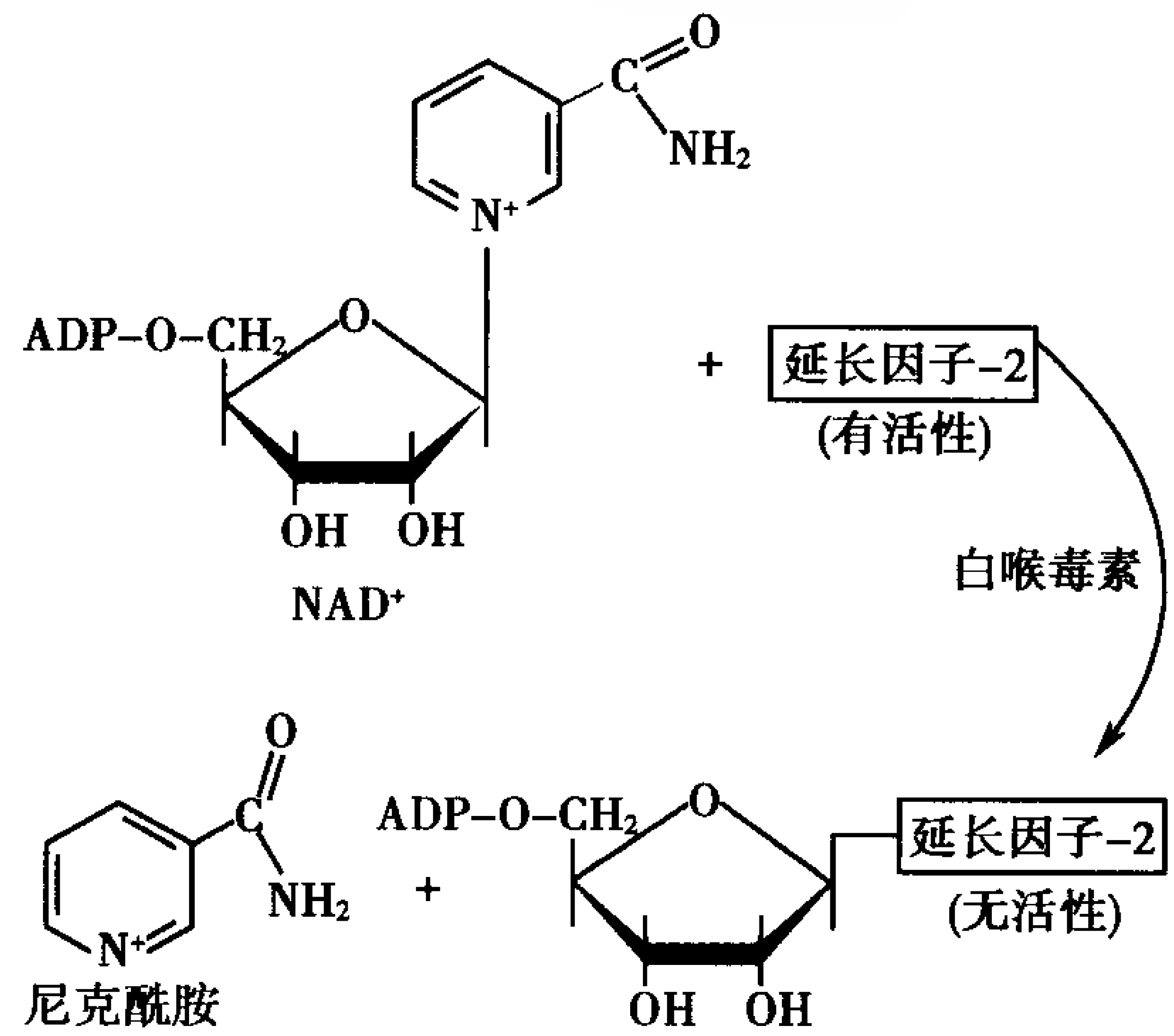
二、其他干扰蛋白质生物合成的物质

（一）毒素

1. 白喉毒素（diphtheria toxin）　某些毒素能在肽链延长阶段阻断蛋白质合成而呈现

毒性，如白喉毒素是真核细胞蛋白质合成的抑制剂，它作为一种修饰酶，可使 eEF-2 发生 ADP 糖基化共价修饰，生成 eEF-2 腺苷二磷酸核糖衍生物，使 eEF-2 失活（图 12-21）。它的催化效率很高，只需微量就能有效抑制蛋白质的生物合成，对真核生物有剧烈毒性。

2. 蓖麻蛋白（ricin）　蓖麻蛋白是蓖麻籽中所含的植物糖蛋白，由 A、B 两条多肽链组成，两链间由 1 个二硫键连接。A 链是一种蛋白酶，可作用于真核生物核糖体大亚基的 28S rRNA，催化其中特异腺苷酸发生脱嘌呤基反应，使 28S rRNA 降解，使核糖体大亚基失活；B 链对 A 链发挥毒性具有重要的促进作用，且 B 链上的半乳糖结合位点也是毒素发挥毒性作用的活性部位。

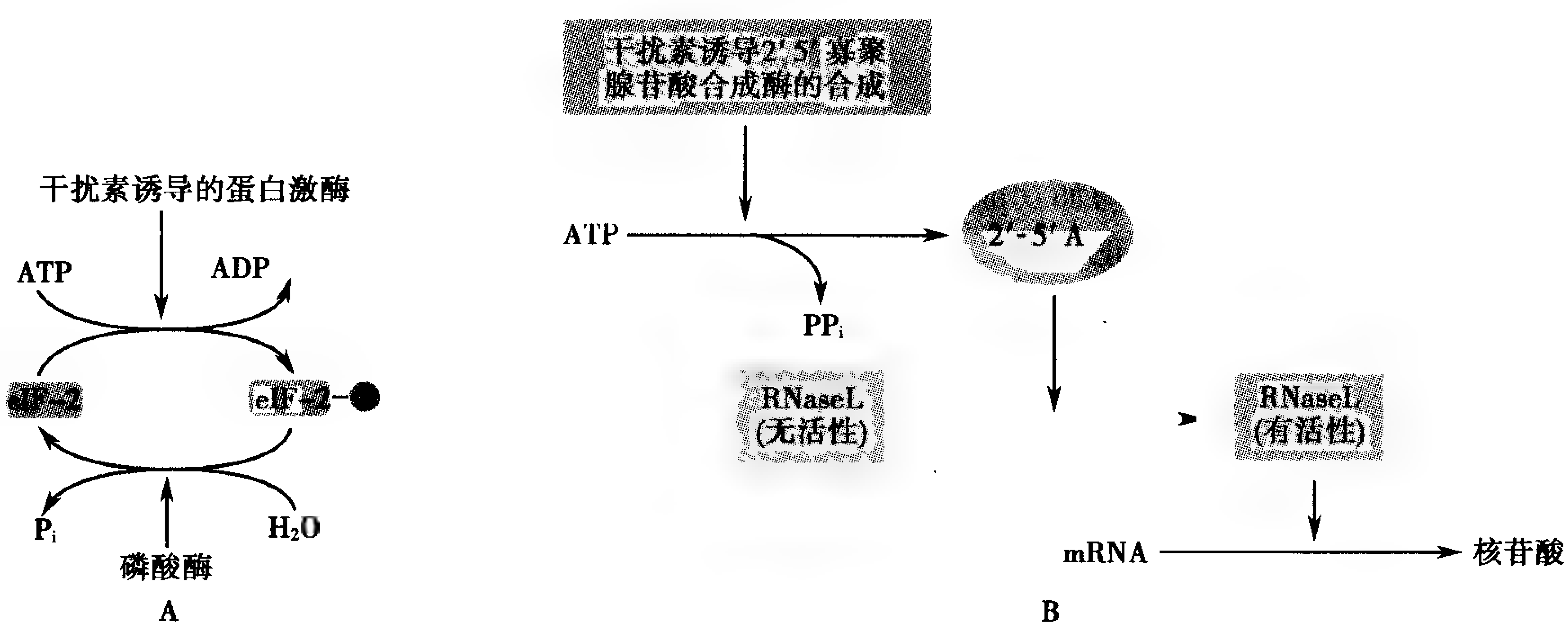


●图 12-21　白喉毒素的作用机制

（二）干扰素

干扰素（interferon，IFN）是真核细胞被病毒感染后分泌的一类具有抗病毒作用的蛋白质，可抑制病毒的繁殖。干扰素分为 α-（白细胞）型、β-（成纤维细胞）型和 γ-（淋巴细胞）型三大类，每类各有亚型，分别具有其特异作用。

干扰素抑制病毒的作用机制有两方面：一是干扰素在某些病毒双链 RNA 存在时，能诱导特异的蛋白激酶活化，该活化的蛋白激酶使 eIF-2 磷酸化而失活，从而抑制病毒蛋白质的合成（图 12-22A）；二是干扰素能与双链 RNA 共同活化特殊的 2′-5′寡聚腺苷酸（2′-5′A）合成酶，催化 ATP 聚合，生成单核苷酸间以 2′-5′磷酸二酯键连接的 2′-5′A，经 2′-5′A 活化核酸内切酶 RNase L，后者可降解病毒 mRNA，从而阻断病毒蛋白质合成（图 12-22B）。



●图 12-22　干扰素抗病毒作用的分子机制
A. 干扰素诱导蛋白激酶活化；B. 干扰素诱导 2′-5′A 合成酶活化

实验证明，干扰素的上述两方面作用各自独立，没有相互依赖关系。干扰素除抗病毒作用外，还有调节细胞生长分化、激活免疫系统等作用，具有十分广泛的临床应用。现在我国已能用基因工程技术生产人类干扰素，该产品是继基因工程生产的胰岛素之后，较早获准在临床使用的基因工程药物。

小　结

蛋白质生物合成也称为翻译，包括3个阶段的反应过程，即氨基酸的活化、肽链形成和肽链形成后的加工及定向输送。蛋白质的生物合成体系包括20种原料氨基酸、模板mRNA、氨基酸的运载工具tRNA、肽链的装配机核糖体、某些重要的酶类和蛋白质因子、能源物质GTP和ATP以及无机离子等。mRNA分子中的3个相邻核苷酸构成一个密码子，代表一种相应的氨基酸或多肽链合成信号，共有64个密码子，其中包括起始密码子AUG、终止密码子UAA、UAG和UGA。遗传密码具有方向性、连续性、简并性、通用性和摆动性。rRNA和多种蛋白质构成核糖体。核糖体上的P位、A位分别结合肽酰tRNA和氨基酰tRNA，原核生物的核糖体还有E位，卸载tRNA从E位排出。核糖体小亚基介导mRNA序列上的密码子与tRNA分子中的反密码子之间精密的相互作用，从而保证了遗传信息转换的准确性。核糖体大亚基蛋白质具有转肽酶活性，催化肽键形成而延长新生肽链。各种底物氨基酸需和相应的tRNA结合，活化为氨基酰-tRNA，运载各种氨基酸进入蛋白质肽链的正确位置，氨基酰-tRNA合成酶在其中起重要作用。

原核生物的翻译起始过程中，mRNA和N-甲酰甲硫氨酰-tRNA先后与核糖体结合，组装成翻译起始复合物，起始因子IF-1、IF-2、IF-3参与这一过程。起始复合物形成后由fMet-tRNA^{fMet}占据P位，而A位留空，准备第二位氨基酰-tRNA的进入。真核生物起始过程与原核生物相似，但核糖体小亚基是先结合Met-tRNAi^{Met}，再结合mRNA。原核生物肽链合成延长时，先是延长因子EF-Tu促进相应氨基酰-tRNA进入A位，称为进位；再是转肽酶催化P位氨基酰基或肽酰基与A位氨基酸形成肽键，称为成肽。最后EF-G的转位酶活性促进肽酰-tRNA从A位移至P位，称为转位，留空A位接受下一氨基酰tRNA进入。通过连续进位、成肽、转位的核糖体循环过程，使合成的肽链从N-端向C-端延伸。当mRNA序列上的终止密码子在核糖体A位出现时，释放因子即结合终止密码子，诱导转肽酶转变为酯酶活性，使合成的肽链释出，促使复合物各组分解离并被再利用，翻译过程终止。

翻译后加工是指无生物学活性的新生多肽链转变为有天然构象和生物学功能的蛋白质的过程。几类蛋白质参与多肽链折叠为天然三维构象的过程。热休克蛋白、伴侣蛋白等分子伴侣家族成员，可通过增加功能性蛋白质折叠产率而促进天然蛋白质折叠。蛋白质二硫键异构酶催化蛋白质形成正确的二硫键连接。肽脯氨酰顺反异构酶促进多肽链在各脯氨酸弯折处形成准确折叠。对肽链一级结构的加工包括去除N-端的甲硫氨酸、个别氨基酸的共价修饰以及使一条多肽链水解产生不同活性肽段等过程；空间结构的加工包括亚基聚合及辅基连接等。蛋白质的靶向输送是使合成的蛋白质前体跨过膜性结构、被定向输送到特定细胞部位而发挥其生物学功能的复杂过程。在真核细胞胞液合成的分泌型蛋白质、溶酶体蛋白质、内质网蛋白质、线粒体蛋白质、质膜蛋白质和细胞核蛋白质等前体肽链中都有特异信号序列，它们引导蛋白质通过不同机制而被靶向输送。

某些药物和生物活性物质能抑制或干扰蛋白质的生物合成。多种抗生素通过抑制蛋白质生物合成而发挥杀菌、抑菌作用。白喉毒素、干扰素等作用的实质，也是通过作用于特异的靶位点而干扰或抑制蛋白质的生物合成。

（陈汉春）

第十三章　基因表达调控

20世纪50年代末，生物科学家们揭示了遗传信息从DNA传递到蛋白质的规律——中心法则。此后，科学家们一直在探索着究竟是何种机制调控着遗传信息的传递。1961年，Francis Jacob和Jacques Monod提出了著名的操纵子学说，开创了基因表达调控研究的新纪元。

操纵子学说的提出

1961年法国F. Jacob和J. L. Monod在研究大肠杆菌乳糖代谢的调节机制中发现有些基因不是作为合成蛋白质的模板发挥作用，而只是起到调节或操纵作用，提出了操纵子学说。从此根据基因功能把基因分为结构基因、调节基因和操纵基因。1965年，F. Jacob和J. L. Monod荣获诺贝尔生理医学奖。1969年，J. R. Beckwith从大肠杆菌的DNA中分离出乳糖操纵子，证实了F. Jacob和J. L. Monod的模型及理论。

基因表达调控的研究使得人们了解到多细胞生物是如何从一个受精卵及所具有的一套遗传基因组，最终形成了具有不同形态和功能的多组织、多器官的个体；也使得人们初步的知晓：为什么同一个体中不同的组织细胞虽然拥有相同的遗传信息，但却可以产生各自专一的蛋白质产物，因而具有完全不同的生物学功能。因此，对基因表达调控的了解是认识生命体不可或缺的重要内容。

第一节　基因表达调控的基本概念

基因表达调控是在细胞生物学、分子生物学以及分子遗传学研究基础上发展起来的新领域，涉及很多基本概念和原理。这些基本概念是认识原核、真核基因表达调控的基础。

一、基因表达是指基因转录及翻译的过程

（一）基因是负载特定遗传信息的DNA片段

从遗传学角度讲，基因（gene）是位于染色体上的遗传基本单位或单元，是含有编码一种RNA，大多数情况是编码一种多肽的信息单位；从分子生物学角度看，基因是负载特定遗传信息的DNA片段，可以编码单个具有生物功能的产物，包括RNA和多肽链，其结构包括由DNA编码序列、非编码调节序列和内含子组成的DNA区域。cDNA（complementary DNA）是人为地由mRNA通过反转录而得（自然界中RNA病毒感染宿主也可进行此种方式的DNA合成），即与mRNA互补的DNA，人们习惯地也将其称为“基因”，它不含基因转录的调控序列，但是含有蛋白质合成的调控序列及多肽链的编码序列。

（二）基因组是一个生物体的整套遗传物质

基因组（genome）是指来自一个生物体的一整套遗传物质。对所有原核细胞（如细

菌）和噬菌体而言，它们的基因组就是单个的环状染色体所含的全部基因；对真核生物而言，基因组是指一个生物体的染色体所包含的全部 DNA，通常又称为染色体基因组。染色体基因组是由来自两个亲本的不同配子所组成，是真核生物主要的遗传物质基础。此外，真核细胞还有线粒体或叶绿体，分别含有线粒体 DNA 或叶绿体 DNA，属核外遗传物质。与染色体 DNA 不同的是，线粒体 DNA 或叶绿体 DNA 是在生殖细胞融合时由一个亲本（卵细胞）的细胞质所提供的，而与减数分裂无关，分别称为线粒体基因组或叶绿体基因组。

（三）基因表达是基因转录及翻译的过程

基因表达（gene expression）就是基因转录及翻译的过程，即：生成具有生物学功能产物的过程。在一定调节机制控制下，大多数基因经历基因激活、转录及翻译等过程，产生具有特定生物学功能的蛋白质分子，赋予细胞或个体一定的功能或形态表型。但并非所有基因表达过程都产生蛋白质。rRNA、tRNA 编码基因转录产生 RNA 的过程也属于基因表达。

不同生物的基因组含有不同数量的基因。细菌的基因组约含 4000 个基因；多细胞生物的基因达数万个。人类基因组含约 3 万～4 万个基因。在某一特定时期或生长阶段，基因组中只有一小部分基因处于表达状态。例如，大肠杆菌通常只有约 5%的基因处于高水平转录活性状态，其余大多数基因不表达，或表达水平极低，即：生成很少的 RNA 或蛋白质。基因表达水平的高低不是固定不变的。例如，平时与细菌蛋白质生物合成有关的延长因子编码基因表达十分活跃，而参与 DNA 损伤修复有关的酶分子编码基因却极少表达；当有紫外线照射引起 DNA 损伤时，这些修复酶编码基因表达就变得异常活跃。可见，生物体中某种功能的基因产物在细胞中的数量会随时间、环境而变化。

二、基因表达具有时间特异性和空间特异性

所有生物的基因表达都具有严格的规律性，即表现为时间特异性和空间特异性。生物物种愈高级，基因表达规律愈复杂、愈精细，这是生物进化的需要。基因表达的时间、空间特异性由特异的基因启动子（序列）和（或）增强子与调节蛋白相互作用决定。

（一）时间特异性是指基因表达按一定的时间顺序发生

按功能需要，某一特定基因的表达严格按一定的时间顺序发生，这就是基因表达的时间特异性（temporal specificity）。如：噬菌体、病毒或细菌侵入宿主后，呈现一定的感染阶段。随感染阶段发展、生长环境变化，这些病原体以及宿主的基因表达都有可能发生改变。有些基因开启，有些基因关闭。例如：霍乱弧菌在感染宿主后，44 种基因的表达上调，193 种基因表达受到抑制，而相伴随的是这些细菌呈现出高传染状态。又如：编码甲胎蛋白（alpha fetal protein，AFP）的基因在胎儿肝细胞中活跃表达，因此合成大量的甲胎蛋白；在成年后这一基因的表达水平很低，几乎检测不到 AFP。但是，当肝细胞发生转化形成肝癌细胞时，编码 AFP 的基因又重新被激活，大量的 AFP 被合成。因此，血浆中 AFP 的水平可以作为肝癌早期诊断的一个重要指标。

多细胞生物从受精卵发育成为一个成熟个体，经历很多不同的发育阶段。在每个不同的发育阶段，都会有不同的基因严格按照自己特定的时间顺序开启或关闭，表现为与分化、发育阶段一致的时间性。因此，多细胞生物基因表达的时间特异性又称阶段特异性（stage specificity）。

（二）空间特异性是指多细胞生物个体在某一特定生长发育阶段，同一基因在不同的

组织器官表达不同

在多细胞生物个体某一发育、生长阶段，同一基因产物在不同的组织器官表达水平是不一样的。在个体生长、发育过程中，一种基因产物在个体的不同组织或器官表达，即在个体的不同空间出现，这就是基因表达的空间特异性（spatial specificity）。如：编码胰岛素的基因只在胰岛的β细胞中表达，从而指导生成胰岛素。又如：编码肌浆蛋白的基因在成纤维细胞（fibroblasts）和成肌细胞（myoblast）中几乎不表达，而在肌原纤维（myofiber）中有高水平的表达。基因表达伴随时间或阶段顺序所表现出的这种空间分布差异，实际上是由细胞在器官的分布所决定的，因此基因表达的空间特异性又称细胞特异性（cell specificity）或组织特异性（tissue specificity）。

三、基因表达的方式及调节存在很大差异

不同种类的生物遗传背景不同，同种生物不同个体生活环境不完全相同，不同的基因功能和性质也不相同。因此，不同的基因对生物体内、外环境信号刺激的反应性不同。有些基因在生命全过程中持续表达，有些基因的表达则受环境影响。基因表达调控（regulation of gene expression）就是指细胞或生物体在接受环境信号刺激时或适应环境变化的过程中在基因表达水平上做出应答的分子机制。按照对刺激的反应性，基因表达的方式或调节类型存在很大差异。

（一）有些基因几乎在所有细胞中持续表达，即：基本表达

有些基因产物对生命全过程都是必需的或必不可少的。这类基因在一个生物个体的几乎所有细胞中持续表达，通常被称为管家基因（housekeeping gene）。例如，三羧酸循环是一中枢性代谢途径，催化该途径各阶段反应的酶的编码基因就属这类基因。管家基因的表达水平受环境因素影响较小，而是在生物体各个生长阶段的大多数、或几乎全部组织中持续表达，或变化很小。我们将这类基因表达称为基本（或组成性）基因表达（constitutive gene expression）。基本的基因表达只受启动序列或启动子与 RNA 聚合酶相互作用的影响，而不受其他机制调节。但实际上，基本的基因表达水平并非绝对“一成不变”，所谓“不变”是相对的。

（二）有些基因的表达受到环境变化的诱导和阻遏

与管家基因不同，另有一些基因表达很容易受环境变化的影响。随外环境信号变化，这类基因表达水平可以出现升高或降低的现象。在特定环境信号刺激下，相应的基因被激活，基因表达产物增加，即这种基因表达是可诱导的。可诱导基因（inducible gene）在一定的环境中表达增强的过程称为诱导（induction）。例如在有 DNA 损伤时，修复酶基因就会在细菌体内被激活，使修复酶被诱导而反应性地增加。相反，如果基因对环境信号应答时被抑制，这种基因称为可阻遏基因（repressible gene）。可阻遏基因表达产物水平降低的过程称为阻遏（repression）。例如，当培养基中色氨酸供应充分时，细菌体内与色氨酸合成有关的酶编码基因表达就会被抑制。可诱导或可阻遏基因除受启动序列或启动子与 RNA 聚合酶相互作用的影响外，尚受其他机制调节，这类基因的调控序列通常含有针对特异刺激的反应元件。

诱导和阻遏是同一事物的两种表现形式，在生物界普遍存在，也是生物体适应环境的基本途径。乳糖操纵子机制是认识诱导和阻遏表达的经典模型（详见本章第三节）。

（三）生物体内不同基因的表达受到协调调节

在生物体内，一个代谢途径通常是由一系列化学反应组成，需要多种酶参与；此外，

还需要很多其他蛋白质参与作用物在细胞内、外区间的转运。这些酶及转运蛋白等的编码基因被统一调节，使参与同一代谢途径的所有蛋白质（包括酶）分子比例适当，以确保代谢途径有条不紊地进行。在一定机制控制下，功能上相关的一组基因，无论其为何种表达方式，均需协调一致、共同表达，即为协调表达（coordinate expression）。这种调节称为协调调节（coordinate regulation）。基因的协调表达体现在多细胞生物体的生长发育全过程。

四、基因表达调控为生物体生长、发育所必需

（一）生物体调节基因表达以适应环境、维持生长和增殖

生物体所处的内、外环境是在不断变化的。所有生物的所有活细胞都必须对内、外环境的变化做出适当反应，以使生物体能更好地适应变化着的环境状态。生物体这种适应环境的能力总是与某种或某些蛋白质分子的功能有关。细胞内某种功能蛋白质分子的有或无、多或少的变化则由编码这些蛋白质分子的基因表达与否、表达水平高低等状况决定。通过一定的程序调控基因的表达，可使生物体表达出合适的蛋白质分子，以便更好地适应环境，维持其生长。

生物体调节基因表达、适应环境是普遍存在的。原核生物、单细胞生物调节基因的表达就是为适应环境、维持生长和细胞分裂。例如，当葡萄糖供应充足时，细菌中与葡萄糖代谢有关的酶编码基因表达增强，其他糖类代谢有关的酶基因关闭；当葡萄糖耗尽而有乳糖存在时，与乳糖代谢有关的酶编码基因则表达，此时细菌可利用乳糖作碳源，维持生长和增殖。高等生物也普遍存在适应性表达方式。经常饮酒者体内醇氧化酶活性较高即与相应基因表达水平升高有关。

（二）生物体调节基因表达以维持细胞分化与个体发育

在多细胞生物，基因表达调控的意义还在于维持细胞分化与个体发育。在多细胞个体生长、发育的不同阶段，细胞中的蛋白质分子种类和含量变化很大；即使在同一生长发育阶段，不同组织器官内蛋白质分子分布也存在很大差异，这些差异是调节细胞表型的关键。例如，果蝇幼虫（蛹）最早期只有一组"母亲效应基因"（maternal effect genes）表达，使受精卵发生头尾轴和背腹轴固定，以后三组"分节基因"（segmentation genes）顺序表达、控制蛹的"分节"发育过程，最后这些"节"分别发育为成虫的头、胸、翅膀、肢体、腹及尾等。高等哺乳类动物的细胞分化，各种组织、器官的发育都是由一些特定基因控制的。当某种基因缺陷或表达异常时，则会出现相应组织或器官的发育异常。

第二节　基因表达调控的基本原理

一、基因表达调控呈现多层次和复杂性

从理论上讲，改变遗传信息传递过程的任何环节均会导致基因表达的变化。首先，遗传信息以基因的形式贮存于DNA分子中，基因拷贝数越多，其表达产物也会越多，因此基因组DNA的部分扩增（amplification）可影响基因表达。在多细胞生物，某一特定类型细胞的选择性扩增可能就是通过这种机制使某种或某些蛋白质分子高表达的结果。为适应某种特定需要而进行的DNA重排（rearrangement）以及DNA甲基化（methylation）等均可在遗传信息水平上影响基因表达。

遗传信息经转录由DNA传向RNA过程中的许多环节，是基因表达调控最重要、最

复杂的一个层次。在真核细胞，初始转录产物需经转录后加工修饰才能成为有功能的成熟RNA，并由细胞核转运至细胞质，对这些转录后加工修饰以及转运过程的控制也是调节某些基因表达的重要方式，例如对mRNA的选择性剪接，RNA编辑等。近年来，微小RNA（microRNA）对基因表达调控的作用也日益受到重视，使我们可以在一个新的层面上理解基因表达调控。蛋白质生物合成即翻译是基因表达的最后一步，影响蛋白质合成的因素同样也能调节基因表达。并且，翻译与翻译后加工可直接、快速地改变蛋白质的结构与功能，因而对此过程的调控是细胞对外环境变化或某些特异刺激应答时的快速反应机制。总之，在遗传信息传递的各个水平上均可进行基因表达调控。

尽管基因表达调控可发生在遗传信息传递过程的任何环节，但发生在转录水平，尤其是转录起始水平的调节，对基因表达起着至关重要的作用，即转录起始是基因表达的基本控制点。以下将重点介绍基因转录起始水平的调节机制。

二、基因转录激活受到转录调节蛋白与启动子相互作用的调节

基因表达的调节与基因的结构、性质，生物个体或细胞所处的内、外环境，以及细胞内所存在的转录调节蛋白均有关。仅就基因转录激活而言，其调节与下列基本要素有关。

（一）特异DNA序列决定基因的转录活性

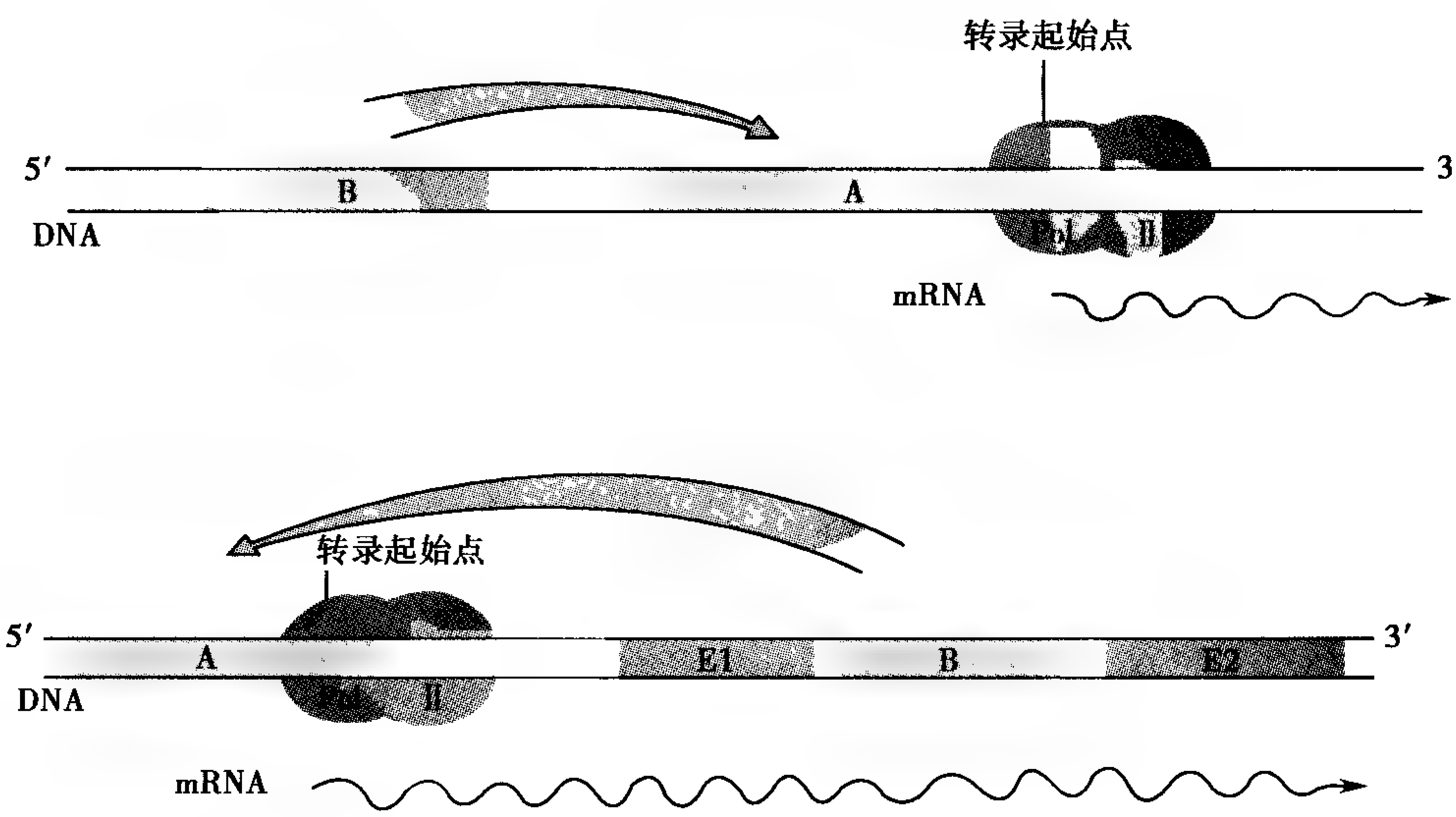
某种基因特异的表达方式与基因结构有关，这里主要指具有调节功能的DNA序列。原核生物大多数基因表达调控是通过操纵子机制实现的。操纵子（operon）通常由2个以上的编码序列（coding sequences）与启动序列（promoter）、操纵序列（operator）以及其他调节序列在基因组中成簇串联组成。启动序列是RNA聚合酶结合并启动转录的特异DNA序列。各种原核基因启动序列特定区域内，通常在转录起始点上游－10及－35区域存在一些相似序列，称为共有序列（consensus sequence）。*E. coli* 及一些细菌启动序列的共有序列在－10区域是TATAAT，又称Pribnow盒（Pribnow box），在－35区域为TT-GACA（图13-1）。这些共有序列中的任一碱基突变或变异都会影响RNA聚合酶与启动序列的结合及转录起始。因此，共有序列决定启动序列的转录活性大小。操纵序列与启动序列毗邻或接近，其DNA序列常与启动序列交错、重叠，它是原核阻遏蛋白的结合位点。当操纵序列结合有阻遏蛋白时会阻碍RNA聚合酶与启动序列的结合，或使RNA聚合酶

	-35区		-10区		RNA转录起始
trp	TTGACA	N17	TTAACT	N7	A
tRNA^{Tyr}	TTTACA	N16	TATGAT	N7	A
lac	TTTACA	N17	TATGTT	N6	A
*rec*A	TTGATA	N16	TATAAT	N7	A
Ara BAD	CTGACG	N16	TACTGT	N6	A
共有序列	TTGACA		TATAAT		

●图13-1　五种 *E. coli* 启动序列的共有序列
－10区域的TATAAT，－35区域的TTGACA为共有序列

不能沿 DNA 向前移动，阻遏转录，介导负性调节。原核操纵子调节序列中还有一种特异 DNA 序列可结合激活蛋白，结合后 RNA 聚合酶活性增强，使转录激活，介导正性调节。

真核基因组结构庞大，参与真核生物基因转录激活调节的 DNA 序列比原核更为复杂。绝大多数真核基因调控机制几乎普遍涉及编码基因两侧的 DNA 序列——顺式作用元件。所谓顺式作用元件（cis-acting element）就是指可影响自身基因表达活性的 DNA 序列。图 13-2 中，A、B 分别代表同一 DNA 分子中的两段特异 DNA 序列。B 序列通过一定机制影响 A 序列，并通过 A 序列控制该基因的转录起始的准确性及频率。A、B 序列就是调节这个基因转录活性的顺式作用元件。不同基因具有各自特异的顺式作用元件。与原核基因类似，在不同真核基因的顺式作用元件中也会时常发现一些共有序列，如 TATA 盒、CCAAT 盒等。这些共有序列就是顺式作用元件的核心序列，它们是真核 RNA 聚合酶或特异转录因子的结合位点。顺式作用元件通常是非编码序列，但是并非都位于转录起始点上游（5′端）。根据顺式作用元件在基因中的位置、转录激活作用的性质及发挥作用的方式，可将真核基因的这些功能元件分为启动子、增强子及沉默子等（见第四节）。



●图 13-2 顺式作用元件

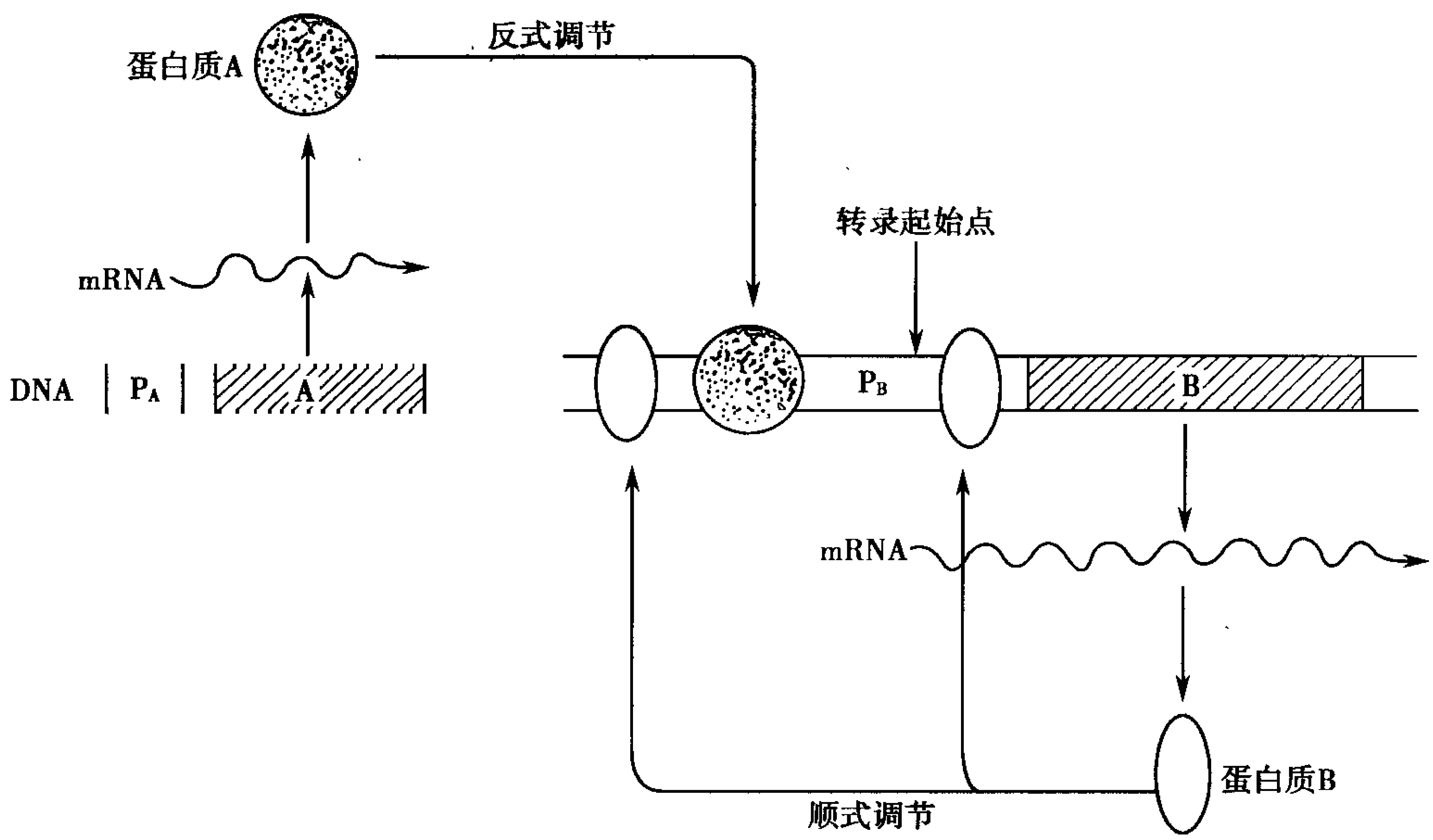
A、B 分别代表同一基因中的两段特异 DNA 序列；B 序列通过一定机制影响 A 序列，并通过 A 序列控制该基因的转录起始的准确性及频率；A、B 序列就是调节这个基因转录活性的顺式作用元件

（二）转录调节蛋白可以增强或抑制转录活性

原核生物基因转录调节蛋白分为三类：特异因子、阻遏蛋白和激活蛋白。特异因子决定 RNA 聚合酶对一个或一套启动序列的特异性识别和结合能力。阻遏蛋白（repressors）可以识别、结合特异 DNA 序列——操纵序列，抑制基因转录，所以阻遏蛋白介导负性调节。阻遏蛋白介导的负性调节机制在原核生物中普遍存在。激活蛋白（activators）可结合启动序列邻近的 DNA 序列，提高 RNA 聚合酶与启动序列的结合能力，从而增强 RNA 聚合酶的转录活性。分解（代谢）物基因激活蛋白（catabolite gene activator protein，CAP）就是一种典型的激活蛋白。有些基因在没有激活蛋白存在时，RNA 聚合酶很少或根本不能结合启动序列，所以基因不能转录。特异因子、阻遏蛋白和激活蛋白等原核调节蛋白都是一些 DNA 结合蛋白。

真核基因转录调节蛋白又称转录调节因子或转录因子（transcription factors）。绝大多数真核转录调节因子由它的编码基因表达后，通过与特异的顺式作用元件的识别、结合

（即 DNA——蛋白质相互作用），反式激活另一基因的转录，故称反式作用蛋白或反式作用因子（trans-acting factors）。并不是所有真核转录调节蛋白都起反式作用，有些基因产物可特异识别、结合自身基因的调节序列，调节自身基因的开启或关闭，这就是顺式调节作用。具有这种调节方式的调节蛋白称为顺式作用蛋白（图 13-3）。大多数转录因子是 DNA 结合蛋白；还有一些真核基因调节蛋白不能直接结合 DNA，而是通过蛋白质——蛋白质相互作用参与 DNA——蛋白质复合物的形成，影响 RNA 聚合酶活性，调节基因转录。



●图 13-3　反式与顺式作用蛋白

蛋白质 A 由它的编码基因表达后，通过与 B 基因特异的顺式作用元件的识别、结合，反式激活 B 基因的转录，蛋白质 A 即反式作用蛋白或反式作用因子。B 基因产物也可特异识别、结合自身基因的调节序列，顺式调节自身基因的开启或关闭，因此，B 调节蛋白称为顺式作用蛋白发挥顺式调节作用

（三）转录调节蛋白通过与 DNA 或与蛋白质相互作用对转录起始进行调节

DNA-蛋白质相互作用（DNA-protein interaction）指反式调节因子与顺式作用元件之间的特异识别及结合。这种结合通常是非共价结合，被调节蛋白识别的 DNA 结合位点通常呈对称或不完全对称结构。这种蛋白质结合位点所在的双螺旋 DNA 的大沟和小沟暴露的碱基侧缘不同，当调节蛋白落入 DNA 的大沟或小沟时，调节蛋白的某些氨基酸残基的侧链（R 基团）就会与 DNA 中的某些碱基相互联系，形成 DNA-蛋白质复合物。

有些调节蛋白在结合 DNA 前，需要通过蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction）形成二聚体（dimer）或多聚体（polymer），即二聚化或多聚化。所谓二聚化（dimerization）就是指两个蛋白质分子单体（monomer）通过一定结构域结合成二聚体，它是调节蛋白结合 DNA 时最常见的形式。由两个相同的分子形成的二聚体称同（质）二聚体（homodimer），由两个不同的分子形成的二聚体称异（质）二聚体（heterodimer）。一般来说，异（质）二聚体比同（质）二聚体具有更强的 DNA 结合能力；有时，由于调节蛋白结构不同，二聚化后可能丧失结合 DNA 的能力。调节蛋白的二聚化或多聚化在原核、真核都有存在。除二聚化或多聚化反应，还有一些调节蛋白不能直接结合 DNA，而是通过蛋白质——蛋白质相互作用间接结合 DNA，调节基因转录，这在真核生物中很常见。因为不同的真核细胞中所存在的转录调节因子种类不同，即使有相同的因子但其浓度

可能不同，所以同一基因在不同细胞中的表达状态不同。

（四）RNA 聚合酶与基因的启动序列/启动子相结合

DNA 元件与调节蛋白对转录激活的调节最终是由 RNA 聚合酶活性体现的。启动序列/启动子的结构、调节蛋白的性质对 RNA 聚合酶活性影响很大。

1. 启动序列（启动子）与 RNA 聚合酶活性 原核启动序列或真核启动子是由转录起始点、RNA 聚合酶结合位点及控制转录活性的调节元件组成。启动序列或启动子的核苷酸序列会影响其与 RNA 聚合酶的亲和力，而亲和力大小则直接影响转录起始的频率。例如，*E. coli* 的某些基因每秒钟转录一次，而另一些基因转录频率在一代细胞中可能低于一次，这种差异被认为是启动序列不同所致。在缺乏调节蛋白的情况下，具有不同碱基序列的两个启动子其转录频率可能相差 10^3 倍以上。如前所述，很多 *E. coli* 启动序列在 −10 和 −35 区域有 TATAAT 和 TTGACA 共有序列。如果一个启动序列的共有序列被置换为非共有序列，或将一启动序列的非共有序列代之以共有序列，则会得到使转录活性降低或增加两种截然不同的结果。可见，RNA 聚合酶活性与启动序列或启动子有关。当然，真核 RNA 聚合酶单独存在时与启动子的亲和力极低或无亲和力，必须与基本转录因子形成复合物才能与启动子结合。因此，对真核 RNA 聚合酶活性来说，除启动子序列，尚与所存在的转录调节因子有关。

2. 调节蛋白与 RNA 聚合酶活性 许多基因与管家基因不同，它们的基因产物浓度随环境信号而变化。这些基因何以能对分子信号做出应答呢？原来这些基因都有一个由启动序列或启动子决定的基础转录频率，一些特异调节蛋白在适当环境信号刺激下在细胞内表达，随后这些调节蛋白通过 DNA-蛋白质相互作用或蛋白质-蛋白质相互作用影响 RNA 聚合酶活性，从而使基础转录频率发生改变，出现表达水平变化。诱导剂、阻遏剂等小分子信号所引起的基因表达都是通过使调节蛋白分子构象改变，直接（DNA-蛋白质相互作用）或间接（蛋白质-蛋白质相互作用）调节 RNA 聚合酶转录起始过程。原核特异因子 σ 可以改变 RNA 聚合酶识别启动序列的特异性，这是调节蛋白调节 RNA 聚合酶活性的实例。当细菌发生热应激时，RNA 聚合酶全酶中通常的 σ70 被 σ32 取代，这时 RNA 聚合酶就会改变其对常规启动序列的识别，而识别并结合另一套启动序列，启动另一套基因表达。这就是所谓的热休克反应（heat shock response）。

第三节 原核基因表达调节

原核基因表达调控与真核存在很多共同之处。但因原核生物没有细胞核，亚细胞结构及其基因组结构要比真核简单得多，所以原核基因表达调控尚有自己的特点。

一、原核基因转录调节特点

原则上讲，原核特异基因的表达也受多级调控，如转录起始、转录终止、翻译调控及 RNA、蛋白质的稳定性等，但其表达开、关调控的关键机制主要发生在转录起始。概括原核基因转录调节有以下特点。

（一）σ 因子决定 RNA 聚合酶识别特异性

前已述及，原核生物细胞仅含有一种 RNA 聚合酶，核心酶参与转录延长，全酶司转录起始。在转录起始阶段，σ 亚基（又称 σ 因子）识别特异启动序列；不同的 σ 因子决定特异基因的转录激活，决定 mRNA、rRNA 和 tRNA 基因的转录。

（二）操纵子模型在原核基因表达调控中具有普遍性

除个别基因外，原核生物绝大多数基因按功能相关性成簇地串联、密集于染色体上，共同组成一个转录单位——操纵子（operon），如乳糖操纵子（*lac* operon）、阿拉伯糖操纵子（*ara* operon）及色氨酸操纵子（*trp* operon）等。因此，操纵子机制在原核基因调控中具有较普遍的意义。一个操纵子只含一个启动序列（promoter，在原核细胞因其隶属于操纵子，故译为启动序列）及数个可转录的编码基因。通常，这些编码基因为 2～6 个，有的多达 20 个以上，在同一启动序列控制下，可转录出多顺反子 mRNA（polycistronic mRNA）。原核基因的协调表达就是通过调控单个启动基因的活性来完成的。

（三）原核操纵子受到阻遏蛋白的负性调节

在很多原核操纵子系统，特异的阻遏蛋白是调控原核启动序列活性的重要因素。当阻遏蛋白与操纵序列结合或解聚时，就会发生特异基因的阻遏或去阻遏。原核基因调控普遍涉及特异阻遏蛋白参与的开、关调节机制。

二、操纵子调控模式在原核基因转录起始的调节中具有普遍性

操纵子机制在原核基因表达调控中具有普遍意义。大多数原核生物的多个功能相关基因串联在一起，依赖同一调控序列对其转录进行调节，使这些相关基因实现协调表达。以下即以乳糖操纵子为例介绍原核生物的操纵子调控模式。

（一）乳糖操纵子的结构

E. coli 的乳糖操纵子含 Z、Y 及 A 三个结构基因，分别编码 β-半乳糖苷酶（β-galactosidase）、透酶（permease）和乙酰基转移酶（transacetylase），此外还有一个操纵序列 O（operator O）、一个启动序列 P（promoter P）及一个调节基因 I。I 基因具有独立的启动序列（PI），编码一种阻遏蛋白，后者与 O 序列结合，使操纵子受阻遏而处于关闭状态。在启动序列 P 上游还有一个分解（代谢）物基因激活蛋白（catabolite gene activator protein，CAP）结合位点。由 P 序列、O 序列和 CAP 结合位点共同构成乳糖操纵子的调控区，三个酶的编码基因即由同一调控区调节，实现基因产物的协调表达（图 13-4）。

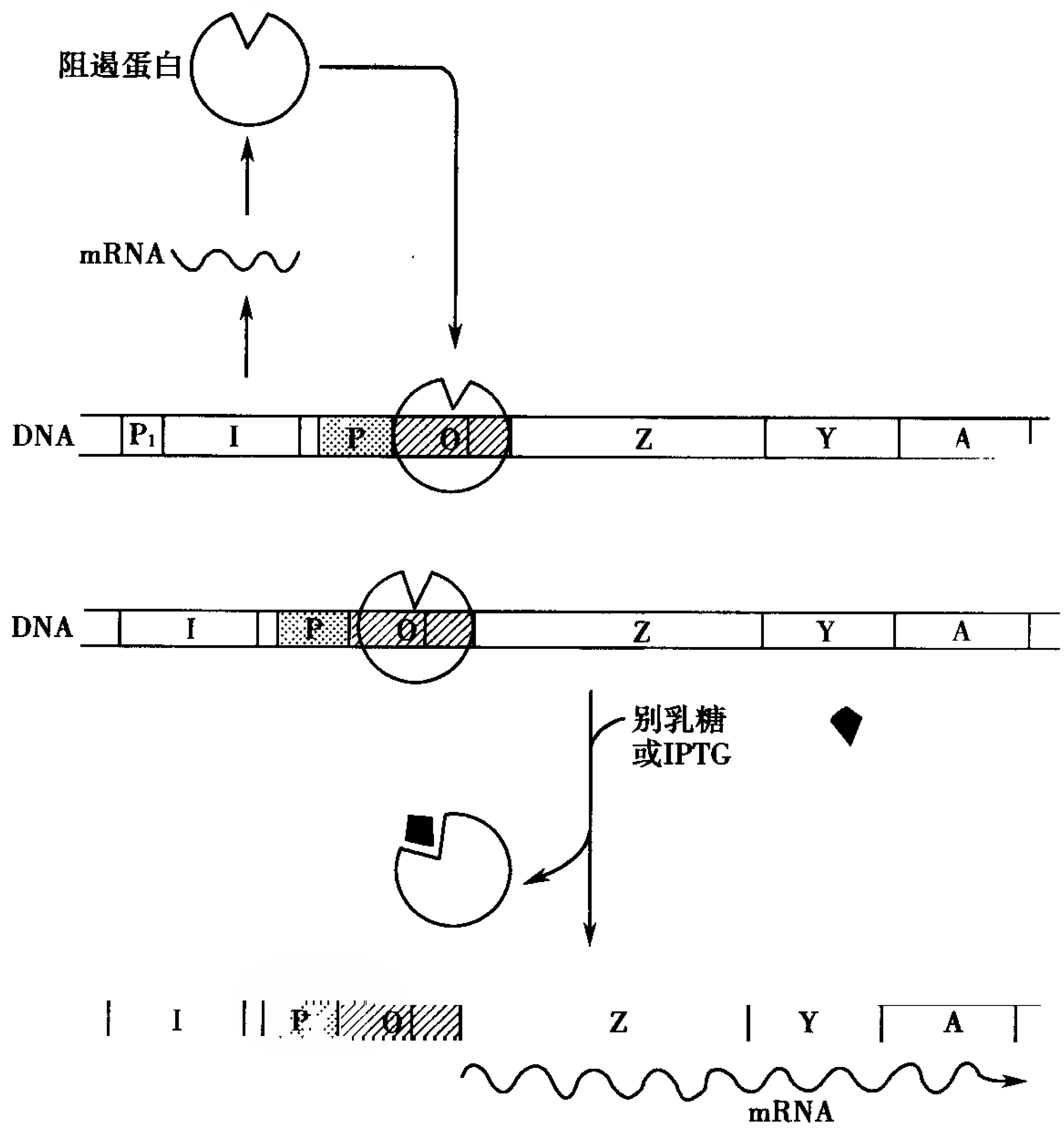
（二）乳糖操纵子受到阻遏蛋白和 CAP 的双重调节

1. 阻遏蛋白的负性调节 在没有乳糖存在时，*lac* 操纵子处于阻遏状态。此时，I 序列在 PI 启动序列作用下表达的 Lac 阻遏蛋白与 O 序列结合，阻碍 RNA 聚合酶与 P 序列结合，抑制转录启动。阻遏蛋白的阻遏作用并非绝对，偶有阻遏蛋白与 O 序列解聚。因此，每个细胞中可能会有寥寥数个分子的 β-半乳糖苷酶、透酶生成。

当有乳糖存在时，*lac* 操纵子即可被诱导。在这个操纵子体系中，真正的诱导剂并非乳糖本身。乳糖经透酶催化、转运进入细胞，再经原先存在于细胞中的少数 β-半乳糖苷酶催化，转变为半乳糖。后者作为一种诱导剂分子结合阻遏蛋白，使蛋白质构象变化，导致阻遏蛋白与 O 序列解离、发生转录，使 β-半乳糖苷酶分子增加可达 1000 倍。半乳糖的类似物异丙基硫代半乳糖苷（isopropylthiogalactoside，IPTG）是一种作用极强的诱导剂，不被细菌代谢而十分稳定，因此在实验室被广泛应用。

2. CAP 的正性调节 分解（代谢）物基因激活蛋白 CAP 是同二聚体，在其分子内有 DNA 结合区及 cAMP 结合位点。当没有葡萄糖及 cAMP 浓度较高时，cAMP 与 CAP 结合，这时 CAP 结合在 *lac* 启动序列附近的 CAP 位点，可刺激 RNA 转录活性，使之提高 50 倍；当有葡萄糖存在时，cAMP 浓度降低，cAMP 与 CAP 结合受阻，因此 *lac* 操纵子表达下降。

由此可见，对 *lac* 操纵子来说 CAP 是正性调节因素，Lac 阻遏蛋白是负性调节因素。



●图 13-4　*lac* 操纵子与阻遏蛋白的负性调节

阻遏蛋白由具有独立启动序列（PI）的 I 基因编码生成后，与操纵序列（O 序列）结合，使操纵子受阻遏而处于关闭状态。半乳糖或 IPTG 等可以结合阻遏蛋白，使其构象变化而去阻遏

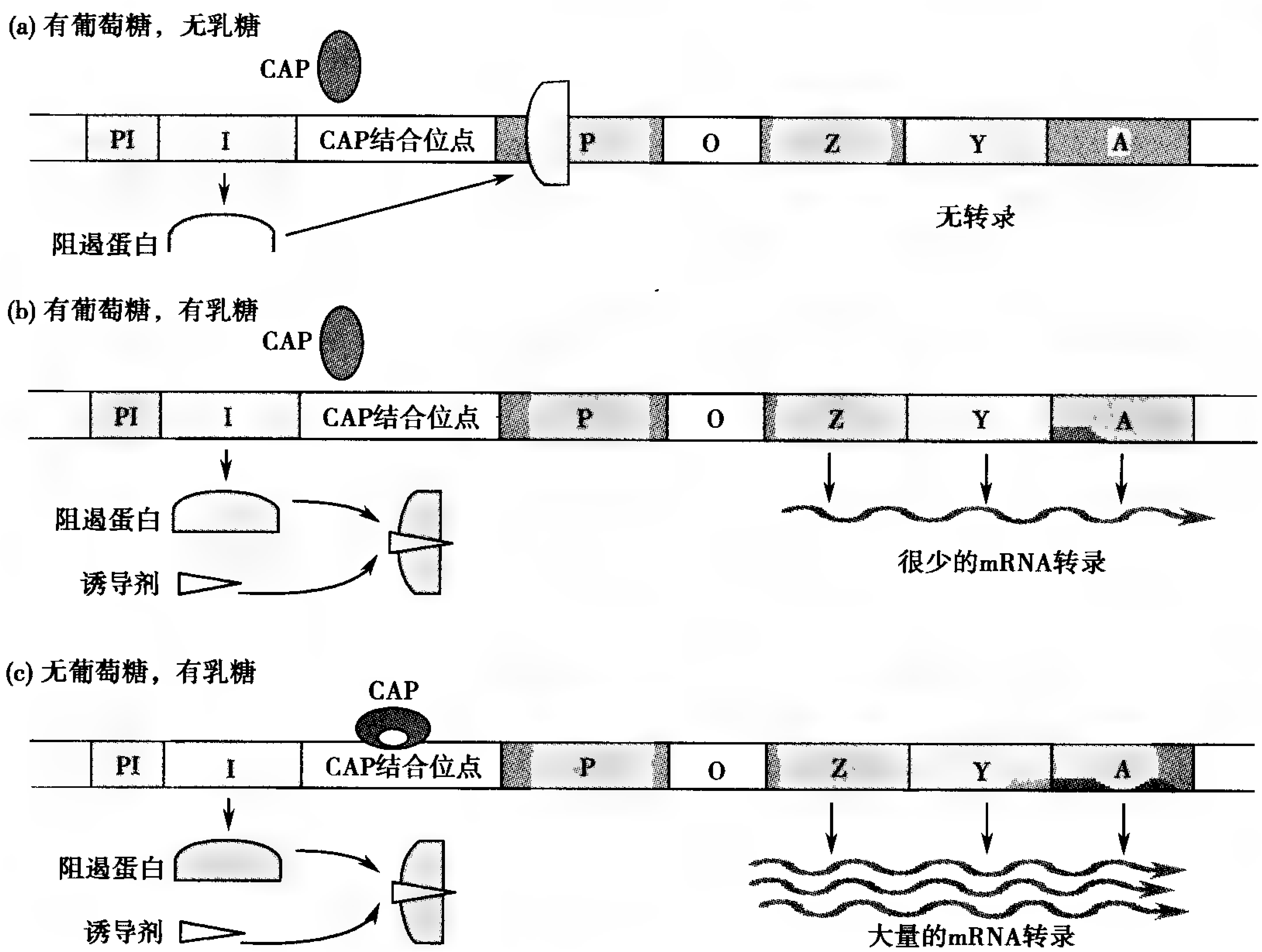
两种调节机制根据存在的碳源性质及水平协调调节 *lac* 操纵子的表达。

3. 协调调节　Lac 阻遏蛋白负性调节与 CAP 正性调节两种机制协调合作：当 Lac 阻遏蛋白封闭转录时，CAP 对该系统不能发挥作用；但是如果没有 CAP 存在来加强转录活性，即使阻遏蛋白从操纵序列上解聚仍几无转录活性。可见，两种机制相辅相成、互相协调、相互制约。由于野生型 *lac* 启动序列作用很弱，所以 CAP 是必不可少的。

lac 操纵子的负性调节能很好地解释在单纯乳糖存在时，细菌是如何利用乳糖作为碳源的。然而，细菌生长环境是复杂的，倘若有葡萄糖或葡萄糖/乳糖共同存在时，细菌首先利用葡萄糖才是最节能的。这时，葡萄糖通过降低 cAMP 浓度，阻碍 cAMP 与 CAP 结合而抑制 *lac* 操纵子转录，使细菌只能利用葡萄糖。葡萄糖对 *lac* 操纵子的阻遏作用称分解代谢阻遏（catabolic repression）。*lac* 操纵子强的诱导作用既需要乳糖存在又需缺乏葡萄糖。*lac* 操纵子协调调节机制如图 13-5。

三、原核生物具有不同的转录终止调节机制

大肠杆菌中存在两种主要转录终止机制。一种只需 RNA 聚合酶而不需其他蛋白质成分，称为不依赖 Rho 因子的转录终止；另一种除 RNA 聚合酶外还需转录终止因子 Rho 因子，称为依赖 Rho 因子的转录终止。不依赖 Rho 因子的终止子序列在结构上有两个显著特征：①两段富含 GC 的反向重复序列，中间间隔若干核苷酸；②下游含一系列 T 序列。这种特殊结构使转录生成的 RNA 分子形成发夹结构及下游的多个 U 序列，从而使转录终



●图 13-5　CAP、阻遏蛋白、cAMP 和诱导剂对 *lac* 操纵子的调节

（a）当葡萄糖存在，没有乳糖存在时，阻遏蛋白封闭转录，CAP 不能发挥作用；（b）当乳糖存在时，去阻遏；但因有葡萄糖存在，CAP 不能发挥作用；（c）当葡萄糖不存在，乳糖存在时，即去阻遏，CAP 又能发挥作用，对 *lac* 操纵子有强的诱导调节

止。依赖 Rho 因子的转录终止常见于噬菌体中，其结构特征尚不清楚。

转录终止也可在距转录起始点较近的位置（约几百 bp）发生，阻止下游基因的转录。这种过早终止受一定机制控制。在大肠杆菌存在两种终止调节方式，一种为衰减（attenuation），另一种为抗终止。前者导致 RNA 链的过早终止，后者则阻止前者的发生，使下游基因得以表达。

四、原核生物在翻译水平同样受到多个环节的调节

与转录类似，翻译一般在起始和终止阶段受到调节，尤其是起始阶段。翻译起始的调节主要靠调节分子，调节分子可直接或间接决定翻译起始位点能否为（核糖）核糖体所利用。调节分子可以是蛋白质，也可以是 RNA。

（一）蛋白质分子结合于启动序列或启动序列周围进行自我调节

无论是单顺反子还是多顺反子 mRNA，许多体系应用了类似的机制：调节蛋白结合 mRNA 靶位点，阻止核糖体识别翻译起始区，从而阻断翻译。调节蛋白一般作用于自身 mRNA，抑制自身的合成，因而这种调节方式称自我控制（autogenous control）。

（二）反义 RNA 结合 mRNA 翻译起始部位互补序列对翻译进行调节

某些 RNA 分子也可调节基因表达，这种 RNA 称为调节 RNA。细菌中有种被称为反义 RNA 的调节 RNA，含有与特定 mRNA 翻译起始部位互补的序列，通过与 mRNA 杂交

阻断 30S 小亚基对起始密码子的识别及与 SD 序列的结合，抑制翻译起始。这种调节称为反义控制（antisense control）。

第四节　真核基因表达调节

真核细胞结构及基因组结构远比原核复杂，其基因表达调控机制发生在染色质活化、基因转录激活、转录后加工、翻译及翻译后加工等水平的调节事件也要复杂得多。应该说，环境信号传导→染色质活化→基因转录激活偶联网络途径是特定条件下（如刺激或应激）某种基因产物表达调控过程的核心途径，其间涉及很多复杂的细胞间及分子间的相互作用与联系。

一、真核基因组具有独特的结构特点

（一）真核基因组结构庞大

哺乳类动物基因组 DNA 由约 3×10^9 bp（碱基对）的核苷酸组成。人类基因组计划（human genome project，HGP）测定人的基因组大约含有 3 万～4 万个基因；根据 2006 年出版的 Gene Ⅸ 一书，人的基因组约含有 2 万～2.5 万个基因，而其中 60％的基因存在着可变剪接，大约 80％的可变剪接能够导致蛋白质序列的变化。值得注意的是，人的基因组中仅有 1％的序列编码蛋白质；此外尚有 5％～10％的重复基因，如编码 tRNA 的基因等；其余 80％～90％的基因组没有编码功能，这是真核基因组与原核基因组截然不同的。这些非编码序列一部分是基因的内含子、调控序列等，还有一部分是重复序列（repeat sequence）等。此外，真核细胞 DNA 与组蛋白等结合形成复杂的染色质（chromatin）结构，位于细胞核内，使转录和翻译在时间和空间上被分割开，增加了复杂的加工和转运过程，使得真核基因表达调控机制更加复杂。

（二）真核基因转录产物为单顺反子

与原核不同，真核基因转录产物为单顺反子（monocistron），即一个编码基因转录生成一个 mRNA 分子、经翻译生成一条多肽链。很多真核蛋白质由几条不同的多肽链组成，因此在真核细胞存在多个基因协调表达的问题。

（三）真核基因组含有大量的重复序列

在原核、真核 DNA 中都有重复出现的核苷酸序列，但在真核更普遍。重复序列长短不一，短的在 10 个核苷酸以下，长的达数百、乃至上千。重复频率也不尽相同。根据重复频率可将重复序列区分为高度重复序列（重复次数可高达 10^6 次）、中度重复序列（10^3～10^4 次）及单拷贝序列。高度、中度重复序列统称多拷贝序列；单拷贝序列在整个基因组中只出现一次或很少的几次。还有一种重复序列是由两个互补序列、在同一 DNA 链上反向排列而成，称为反向重复序列（inverted repeat）。重复序列有种属特异性，基因组愈大、重复序列含量愈丰富。人的基因组中约有 50％以上的序列是重复序列。

重复序列与生物进化有关。某些重复序列发生在调控区，如转录终止区、衰减调控区及某些酶或蛋白因子结合位点，可能对 DNA 复制、转录调控具有重要意义。还有一些重复序列，如卫星 DNA（satellite DNA），一种具有固定重复单位的串联重复序列，具有高度的遗传多态性，并遵循孟德尔遗传规律，可以作为很好的遗传标记。

（四）真核基因中存在非编码序列和间隔区，故：具有不连续性

真核结构基因两侧存在有不被转录的非编码序列，往往是基因表达的调控区。在编码

基因内部尚有内含子（intron）、外显子（exon）之分，因此真核基因是不连续的。内含子在转录后经一定规律的剪接（splicing）机制从转录本中去除，形成成熟的 mRNA（见第十一章）。不同剪接方式可形成不同的 mRNA，翻译出不同的多肽链，因此转录后的剪接过程是真核基因表达调控的另一重要环节。

二、真核基因表达调控更为复杂

同原核一样，转录起始仍是真核基因表达调控的最基本环节，而且某些机制是一样的。但在下述方面与原核存在明显差别。

（一）真核细胞内含有多种 RNA 聚合酶

如前所述，真核 RNA 聚合酶有三种，即 RNA Pol Ⅰ、Ⅱ及Ⅲ，分别负责三种 RNA 转录。每种 RNA 聚合酶由大约 10 个亚基组成，其中有些亚基是相同的，有些为特有的。例如，TATA 盒结合蛋白（TATA-binding protein，TBP）就为三种聚合酶所共有；对 Pol Ⅱ催化的 mRNA 转录来说，转录因子 D（TFⅡ D）起核心作用。TFⅡ D 是一种由 TBP 和 TBP 相关因子（TBP associated factor，TAF）组成的多蛋白质复合物，TBP 相关因子对传递上游激活序列（upstream activator sequences，UAS）的信息至关重要。

（二）处于转录激活状态的染色质结构发生明显变化

当基因被激活时，可观察到染色质相应区域发生某些结构和性质变化，这些具有转录活性的染色质被称为活性染色质（active chromatin）。

1. 对核酸酶敏感　活化基因一个明显特性是对核酸酶极度敏感，当用 DNase I 处理时染色质 DNA 会出现一些 DNase I 超敏位点（hypersensitive site）。超敏位点常发生在基因的 5′侧翼区、3′侧翼区，甚至可在转录区内，通常位于调节蛋白结合位点附近。

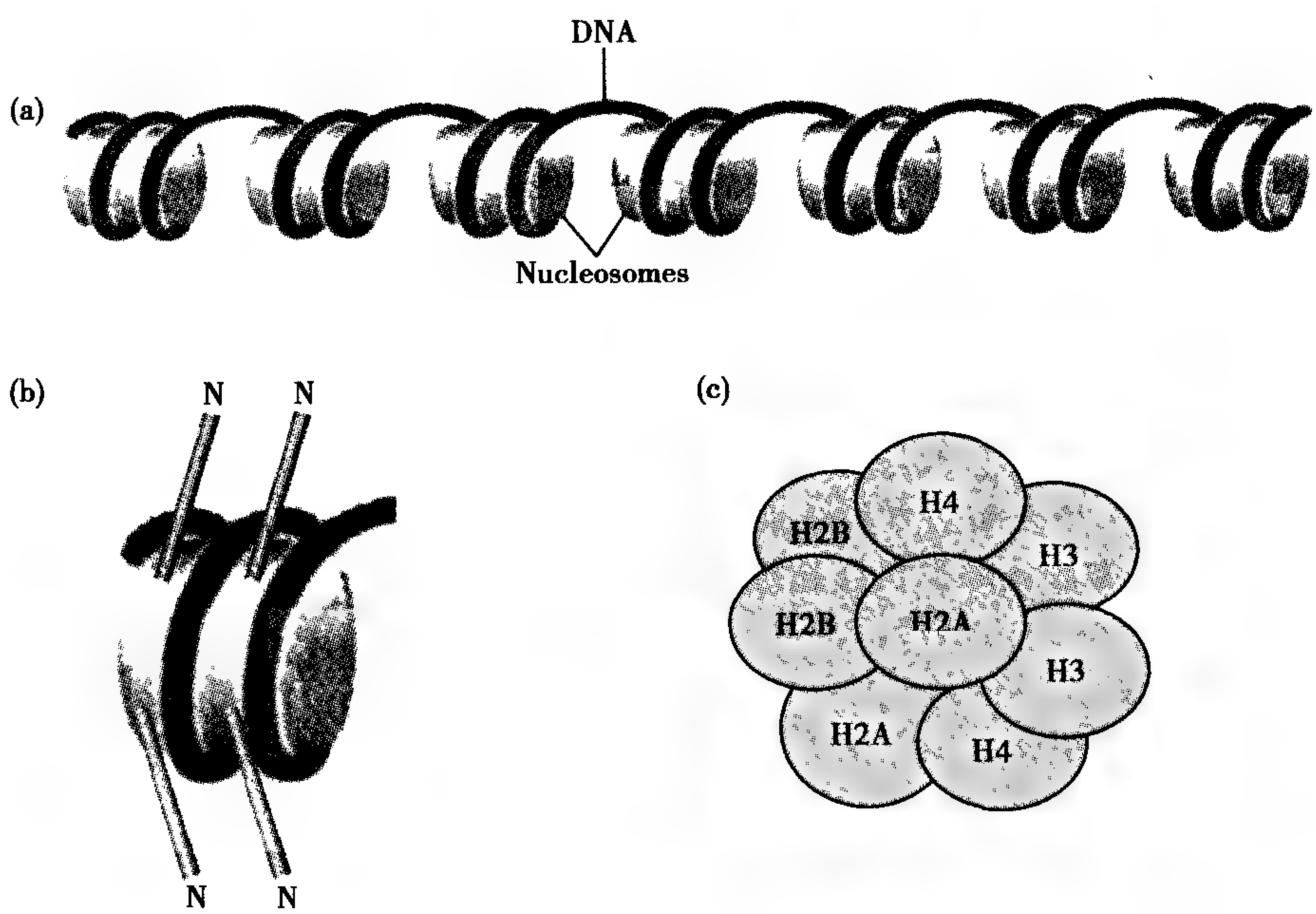
2. DNA 拓扑结构变化　几乎所有天然状态的双链 DNA 均以负性超螺旋构象存在。当基因活化时，RNA 聚合酶前方的转录区 DNA 拓扑结构为正性超螺旋构象，而在其后面的 DNA 则为负性超螺旋构象。负性超螺旋构象有利于核小体结构的再形成，而正性超螺旋构象不仅阻碍核小体结构形成，而且促进组蛋白 H2A・H2B 二聚体的释放，使 RNA 聚合酶有可能向前移动，进行转录。

3. DNA 碱基的甲基化修饰变化　真核 DNA 中有约 5%的胞嘧啶被甲基化修饰为 5-甲基胞嘧啶（5-methylcytidine），这种甲基化最常发生在某些基因的 5′侧翼区的 CpG 序列（又称“CpG 岛”）。甲基化范围与基因表达程度呈反比关系。处于转录活化状态的基因 CpG 序列一般是低甲基化的，而不表达或处于低表达水平的基因其 CpG 序列则高度甲基化。DNA 碱基的甲基化处于一个动态过程，甲基化酶催化甲基与胞嘧啶共价结合，去甲基化酶则负责去除甲基。DNA 碱基的甲基化和去甲基化在基因表达调控中发挥重要作用。基因组印记（genomic imprinting）就是一个很好的例证。基因组印记是指同一等位基因根据其是母方还是父方的来源进行选择性差异表达的现象。来自父方和母方的等位基因在通过精子和卵子传递给子代时产生新的甲基化模式，使带有的亲代印记全部被消除，并在配子形成过程中产生新的印迹，使得等位基因具有不同的表达特性。基因组印记是一个动态过程，DNA 碱基的甲基化修饰以及组蛋白的乙酰化或甲基化修饰对于印记的维持十分重要。通常对印记基因的调控是使等位位点一方的印记控制区（imprinting control region，ICR）甲基化。

4. 组蛋白变化　组蛋白变化包括：富含 Lys 组蛋白水平降低，即 H1 组蛋白减少；H2A・H2B 二聚体不稳定性增加，易于从核心组蛋白中被置换出来；组蛋白 H3、H4 发生乙酰化、甲基化或磷酸化修饰，使核小体结构变得不稳定或松弛，降低核小体对 DNA

的亲和力，易于基因转录。

在真核细胞中，核小体是染色质的主要结构元件，四种组蛋白（H2A，H2B，H3 和 H4 各 2 个分子）组成的八聚体构成核小体的核心区（core particle），其外面盘绕着 DNA 双螺旋链。每个组蛋白的氨基端都会伸出核小体外，形成组蛋白尾巴（图 13-6）。这些尾巴可以形成核小体间相互作用的纽带，同时也是发生组蛋白修饰的位点。这些修饰包括对组蛋白中富含的赖氨酸、精氨酸、组氨酸等带有正电荷的碱性氨基酸进行的乙酰化、磷酸化和甲基化等修饰过程。一般来说，乙酰化修饰能够中和组蛋白尾巴上碱性氨基酸残基的正电荷，减弱组蛋白与带有负电荷的 DNA 之间的结合，选择性的使某些染色质区域的结构从紧密变得松散，有利于转录因子与 DNA 的结合，从而开放某些基因的转录，增强其表达水平。而组蛋白甲基化通常不会在整体上改变组蛋白尾巴的电荷，但是能够增加其碱性度和疏水性，因而增强其与 DNA 的亲和力。乙酰化修饰和甲基化修饰都是通过改变组蛋白尾巴与 DNA 之间的相互作用发挥基因表达调控的功能，而乙酰化修饰和甲基化修饰往往又是相互排斥的；组蛋白的磷酸化修饰在细胞有丝分裂和减数分裂期间染色体浓缩以及基因转录激活过程中发挥重要的调节作用。



● 图 13-6　组蛋白结构及其化学修饰

（a）组蛋白与 DNA 组成的核小体；（b）组蛋白的氨基端伸出核小体，形成组蛋白尾巴；（c）四种组蛋白组成的八聚体

组蛋白乙酰化、磷酸化和甲基化修饰对染色质结构和功能的影响总结于表 13-1。此外，组蛋白修饰还包括泛素化修饰和 ADP-核糖基化。各种不同修饰的效应可能是协同的，也可能是相反的；可能是同时发生，也可能是在不同时刻；修饰的组蛋白底物可能相同，也可能不同。组蛋白修饰对于基因表达影响的机制也包括两种相互包容的理论。即组蛋白的修饰直接影响染色质或核小体的结构；化学修饰征集了其他调控基因转录的蛋白质，为其他功能分子与组蛋白结合搭建了一个平台。这些理论构成了“组蛋白密码”的假说。当然，组蛋白修饰对基因表达调控的研究还刚刚开始，许多问题仍有待于解决。

（三）在真核基因表达调控中以正性调节占主导

尽管已发现某些基因含有负性顺式作用元件存在，很多真核调节因子既可作为激活蛋

白又可作为阻遏蛋白发挥调节作用，但负性调节元件并不普遍存在。较大真核基因组广泛存在正性调节机制，其原因有二：①采用正性调节机制更精确：真核基因组结构庞大，在不适当位点出现特异结合序列机会增多，使 DNA-蛋白质相互作用特异性降低。如果采用多种调节蛋白可提高调节蛋白与 DNA 相互作用的特异性，这是因为功能上并列、相关的几种蛋白质结合位点重复发生的概率是极小的。一个负性调节元件的结合足可阻断 RNA 聚合酶的结合，因此同时采用几个负性调节元件一般不会改变特异性；相反，如果采用多种正性调节元件、正性调节蛋白可提高基因表达调节的特异性和精确性。②采用负性调节不经济：试想，人类基因组 3 万～4 万个基因都采用负性调节，那么每个细胞必须合成 3 万～4 万个阻遏蛋白，这显然是不经济、且无法实现的。在正性调节中，大多数基因不结合调节蛋白，所以是没有活性的；只要细胞表达一组激活蛋白时，相关靶基因即可被激活。

表 13-1　组蛋白修饰对染色质结构与功能的影响

组蛋白	氨基酸残基位点	修饰类型	功能
H3	Lys-4	甲基化	激活
H3	Lys-9	甲基化	染色质浓缩
H3	Lys-9	甲基化	DNA 甲基化所必需
H3	Lys-9	乙酰化	激活
H3	Ser-10	磷酸化	激活
H3	Lys-14	乙酰化	防止 Lys-9 的甲基化
H3	Lys-79	甲基化	端粒沉默
H4	Arg-3	甲基化	
H4	Lys-5	乙酰化	装配
H4	Lys-12	乙酰化	装配
H4	Lys-16	乙酰化	核小体装配
H4	Lys-16	乙酰化	Fly X 激活

Lys＝赖氨酸；Ser＝丝氨酸；Arg＝精氨酸。译自：Gene IX，by Benjamin Lewin

（四）在真核细胞中转录与翻译分隔进行

真核细胞有细胞核及胞质等区间分布，转录与翻译在不同细胞部位进行，转录在细胞核，翻译在细胞质。因此，转录与翻译产物的分布、定位等环节均可以被调控。

（五）转录后修饰、加工更为复杂

鉴于真核基因结构特点，转录后剪接及修饰等过程比原核复杂。

三、RNA Pol Ⅰ和 Pol Ⅲ转录体系的调节相对简单

由 RNA Pol Ⅰ催化生成的基因转录产物为 rRNA 前体，RNA Pol Ⅲ催化生成的基因转录产物为 tRNA 前体及 5S rRNA 等。rRNA 和 tRNA 直接参与蛋白质合成过程，它们的表达水平将直接影响蛋白质编码基因的表达。

（一）RNA Pol Ⅰ转录体系的控制

基因组中存在多套 rRNA 前体转录单位，在 DNA 分子上成簇排列。RNA Pol Ⅰ催化转录的功能相对单一，其转录产物只有 rRNA 前体，经剪接修饰生成除 5S rRNA 外的各

种 rRNA，转录起始所需的调控序列及转录因子的种类也相对较少。

人 rRNA 前体基因的启动子只有两个元件，一个位于转录起始点附近（-45～+20bp），它的存在足以起始转录，因而称为核心元件（core element）或核心启动子（core promoter）。另一个元件位于起始点上游-156～-107bp，可大大提高转录起始效率，称上游控制元件（upstream control element，UCE）。

RNA Pol Ⅰ需两种转录因子来正确有效的帮助起始转录。上游结合因子 1（upstream binding factor 1，UBF1）既能与 UCE 结合又能与核心元件特异结合。选择性因子 1（selectivity factor 1，SL1）继 UBF1 后与两个元件结合，它的结合无序列特异性，可能与蛋白质间的相互作用有关。上述结合完成后，RNA Pol Ⅰ即与启动子结合而起始转录。

（二）RNA Pol Ⅲ转录体系的控制

RNA Pol Ⅲ催化转录多种小分子 RNA 的生成，包括 tRNA、5S rRNA 和一部分小核 RNA（small nuclear RNAs，snRNAs），这里主要讨论 tRNA 和 5S rRNA 基因的转录调节。这两类基因结构方面颇具特色，其启动子位于转录起始点下游即转录区内，称内部控制区（internal control regions，ICR）。

tRNA 基因的 ICR 主要由 A 盒（TGGCNNAGTGG）和 B 盒（GGTTCGANNCC）两个元件组成。RNA Pol Ⅲ转录起始需两种转录因子 TFⅢ C 和 TFⅢ B，两者均为多亚基结构。转录起始首先由 TFⅢ C 结合 A 盒和 B 盒开始，然后 TFⅢ B 结合于 A 盒上游，这一结合主要通过 TFⅢ C 和 TFⅢ B 相互作用实现，而非 TFⅢ B 对 DNA 序列的特异识别。一旦 TFⅢ B 结合，RNA Pol Ⅲ即可结合于转录起始点附近开始转录。TFⅢ B 结合后 TFⅢ C 即可脱落，对转录起始无影响。因此 TFⅢ B 是必需的转录因子，而 TFⅢ C 是帮助结合的辅助因子。

5S rRNA 的转录起始需三种转录因子，除上述两种外尚需 TFⅢ A。TFⅢ A 首先与 ICR 结合，而后 TFⅢ C，其余过程与 tRNA 基因的转录相同。TFⅢ A 与 TFⅢ C 均起辅助因子的作用，无论是 tRNA 还是 5S rRNA 基因，真正的转录起始因子为 TFⅢ B。TFⅢ A 和 TFⅢ C 的作用在于协助 TFⅢ B，使 RNA Pol Ⅲ结合于转录起始点。TFⅢ B 与 SL1 一样，在定位 RNA Pol 方面起重要作用。

四、RNA PolⅡ转录起始的调节非常复杂

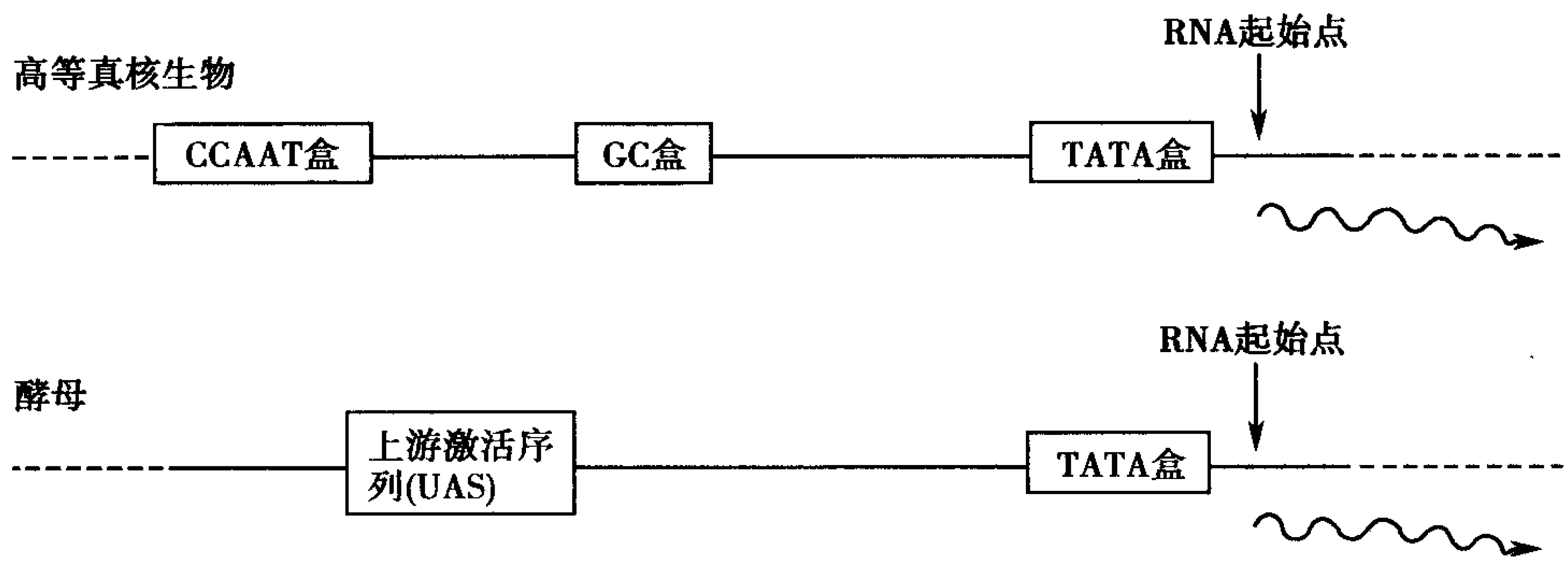
RNA Pol Ⅱ参与转录生成所有 mRNA 前体及大部分 snRNAs。同 RNA Pol Ⅰ和 RNA Pol Ⅲ一样，RNA Pol Ⅱ需要转录因子协助才能结合转录起始点并起始转录过程。但相比前两者，参与 RNA Pol Ⅱ转录起始的 DNA 调控序列及转录因子要复杂得多，以满足 RNA Pol Ⅱ转录成千上万种处于不同表达水平的基因的需要。

（一）真核基因顺式作用元件影响基因转录活性

按功能特性，真核基因顺式作用元件分为启动子、增强子及沉默子。

1. 启动子　真核基因启动子是原核操纵子中启动序列（promoter）的同义语，指的是 RNA 聚合酶结合位点周围的一组转录控制组件，每一组件含 7～20bp 的 DNA 序列。启动子包括至少一个转录起始点（transcription start site，initiation site）以及一个以上的功能组件。在这些功能组件中最具典型意义的就是 TATA 盒，它的共有序列是 TATAAAA。TATA 盒通常位于转录起始点上游-30～-25bp 区域，控制转录起始的准确性及频率。TATA 盒是基本转录因子 TFⅡ D 结合位点（见后）。除 TATA 盒外，GC 盒（GGGCGG）和 CAAT 盒（GCCAAT）也是很多基因中常见的功能组件，它们通常位于转录起始点上游-110～-30bp 区域。此外，还发现很多其他类型的功能组件。由 TATA 盒及转录起始

点即可构成最简单的启动子。典型的启动子则由 TATA 盒及上游的 CAAT 盒和（或）GC 盒组成（图 13-7），这类启动子通常具有一个转录起始点及较高的转录活性。然而，还有很多启动子并不含 TATA 盒，这类启动子分为两类：一类为富含 GC 的启动子，最初发现于一些管家基因，这类启动子一般含数个分离的转录起始点，并有数个转录因子 SP1 结合位点，对基本转录活化有重要作用；另一类启动子既不含 TATA 盒，也没有 GC 富含区，这类启动子可有一个或多个转录起始点，大多转录活性很低或根本没有转录活性，而是在胚胎发育、组织分化或再生过程中受调节。



●图 13-7　真核基因启动子的典型结构

2. 增强子　所谓增强子（enhancer）就是远离转录起始点（1～30kb）、决定基因的时间、空间特异性表达、增强启动子转录活性的 DNA 序列，其发挥作用的方式通常与方向、距离无关。增强子也是由若干功能组件组成，有些功能组件既可在增强子、也可在启动子中出现。这些功能组件是特异转录因子结合 DNA 的核心序列。增强子和启动子常交错覆盖或连续。从功能上讲，没有增强子存在，启动子通常不能表现活性；没有启动子时，增强子也无法发挥作用。有时，对结构密切联系而无法区分的启动子、增强子样结构则统称启动子。通常在文献中描述的、具有独立的转录活性和决定基因时间、空间特异性表达能力的启动子就是这类定义的启动子。在酵母，有一种类似高等真核增强子样作用的序列，称为上游激活序列（upstream activator sequences，UASs），其在转录激活中的作用及方式与增强子类似（图 13-7）。

3. 沉默子　某些基因含有负性调节元件——沉默子（silencer），当其结合特异蛋白因子时，对基因转录起阻遏作用。还有些 DNA 序列既可作为正性、又可作为负性调节元件发挥顺式调节作用，这取决细胞内存在的 DNA 结合因子的性质。

（二）反式作用因子是真核细胞中重要的转录调控蛋白

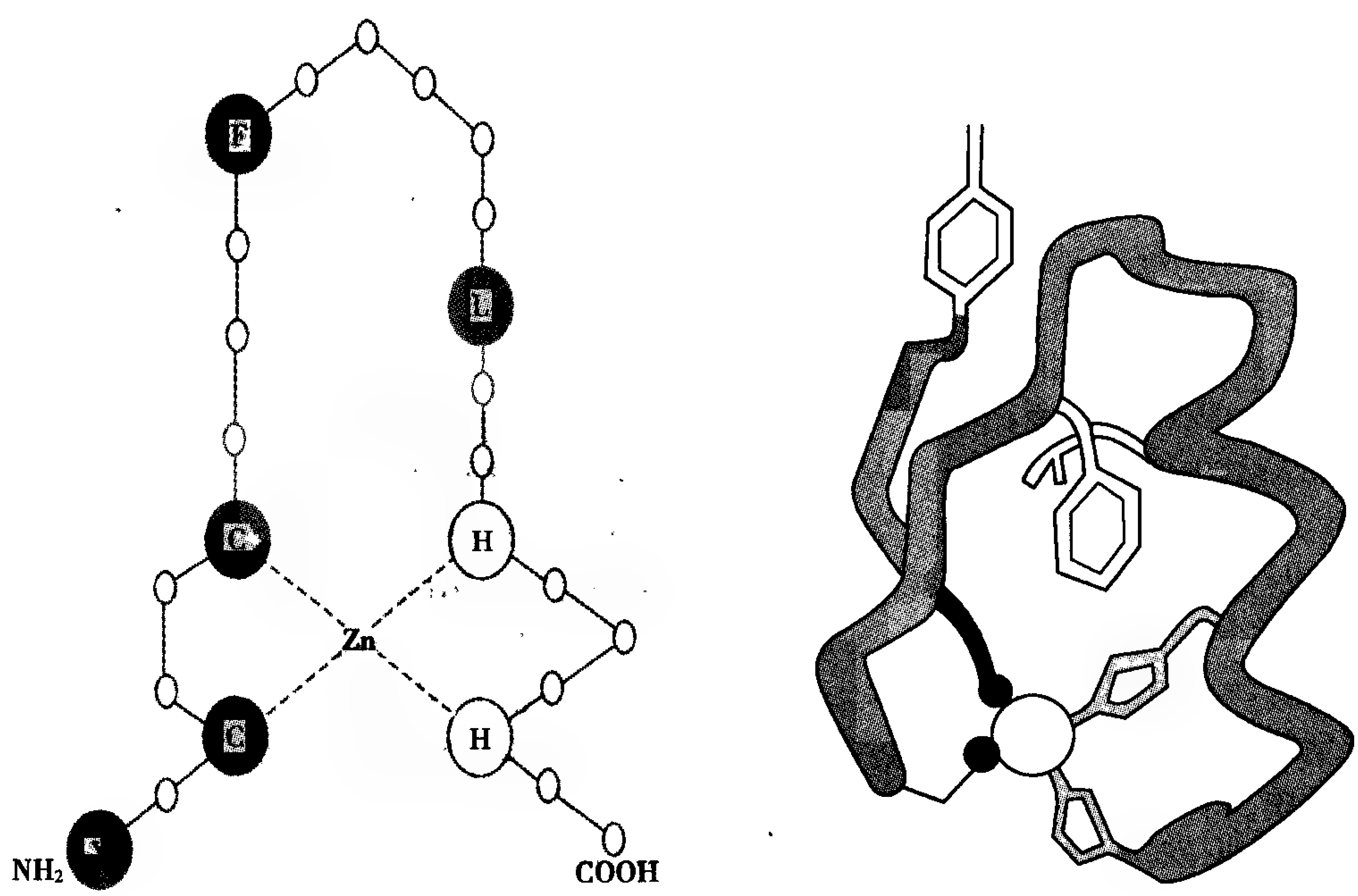
除少数顺式作用蛋白，大多数转录调节因子以反式作用调节基因转录。

1. 转录调节因子的分类　转录调节因子简称转录因子（transcription factors，TF）。按功能特性可将其分为两类：①基本转录因子（general transcription factors）——是 RNA 聚合酶结合启动子所必需的一组蛋白质因子，决定三种 RNA（tRNA、mRNA 及 rRNA）转录的类别。有人将其视为 RNA 聚合酶的组成成分或亚基，故称基本转录因子。对三种 RNA 聚合酶来说，除个别基本转录因子成分是通用的外，如 TFⅡD；大多数成分是不同 RNA 聚合酶所特有的。例如 TFⅡA、TFⅡB、TFⅡE、TFⅡF 及 TFⅡH 为 RNA 聚合酶Ⅱ催化所有 mRNA 转录所必需。②特异转录因子（special transcription factors）——为个别基因转录所必需，决定该基因的时间、空间特异性表达，故称特异转录因子。此类特异因子有的起转录激活作用，有的起转录抑制作用。前者称转录激活因子（transcription activators），后者称转录抑制因子（transcription inhibitors）。转录激活因子通常是一

些增强子结合蛋白（enhancer binding protein，EBP）；多数转录抑制因子是沉默子结合蛋白，但也有抑制因子以不依赖 DNA 的方式起作用，而是通过蛋白质-蛋白质相互作用“中和”转录激活因子或 TFⅡ D，降低它们在细胞内的有效浓度，抑制基因转录。因为在不同的组织或细胞中各种特异转录因子分布不同，所以基因表达状态、方式不同。

2. 转录调节因子结构　所有转录因子至少包括两个不同的结构域：DNA 结合域（DNA binding domain）和转录激活域（activation domain）；此外，很多转录因子还包含一个介导蛋白质-蛋白质相互作用的结构域，最常见的是二聚化结构域。①DNA 结合域——通常由含 60～100 个氨基酸残基组成。最常见的 DNA 结合域的结构形式是锌指（zinc finger）结构及碱性氨基酸残基形成的 α 螺旋。锌指结构最早发现于结合 GC 盒的 SP1 转录因子，由 30 个氨基酸残基组成，其中有 2 个 Cys 和 2 个 His，4 个氨基酸残基分别位于正四面体的顶角，与四面体中心的锌离子配价结合，稳定锌指结构。在 Cys 和 His 之间有 12 个氨基酸残基，其中数个为保守的碱性残基（图 13-8）。识别 CAAT 盒的转录因子 CTF1 DNA 结合域是碱性 α 螺旋。类似的碱性 DNA 结合域还见于碱性亮氨酸拉链（basic leucine zipper，bZIP）和碱性螺旋-环-螺旋（basic helix-loop-helix，bHLH）结构的碱性氨基酸伸展。②转录激活域——由 30～100 个氨基酸组成。根据氨基酸组成特点，转录激活域又有酸性激活域（acidic activation domain）、谷氨酰胺富含域（glutamine-rich domain）及脯氨酸富含域（proline-rich domain）。③二聚化结构域——二聚化作用与 bZIP 的亮氨酸拉链、bHLH 的螺旋-环-螺旋结构有关。

上面介绍的各种功能结构形式都是最典型、最常见的。此外尚有一些独特的结构形式。



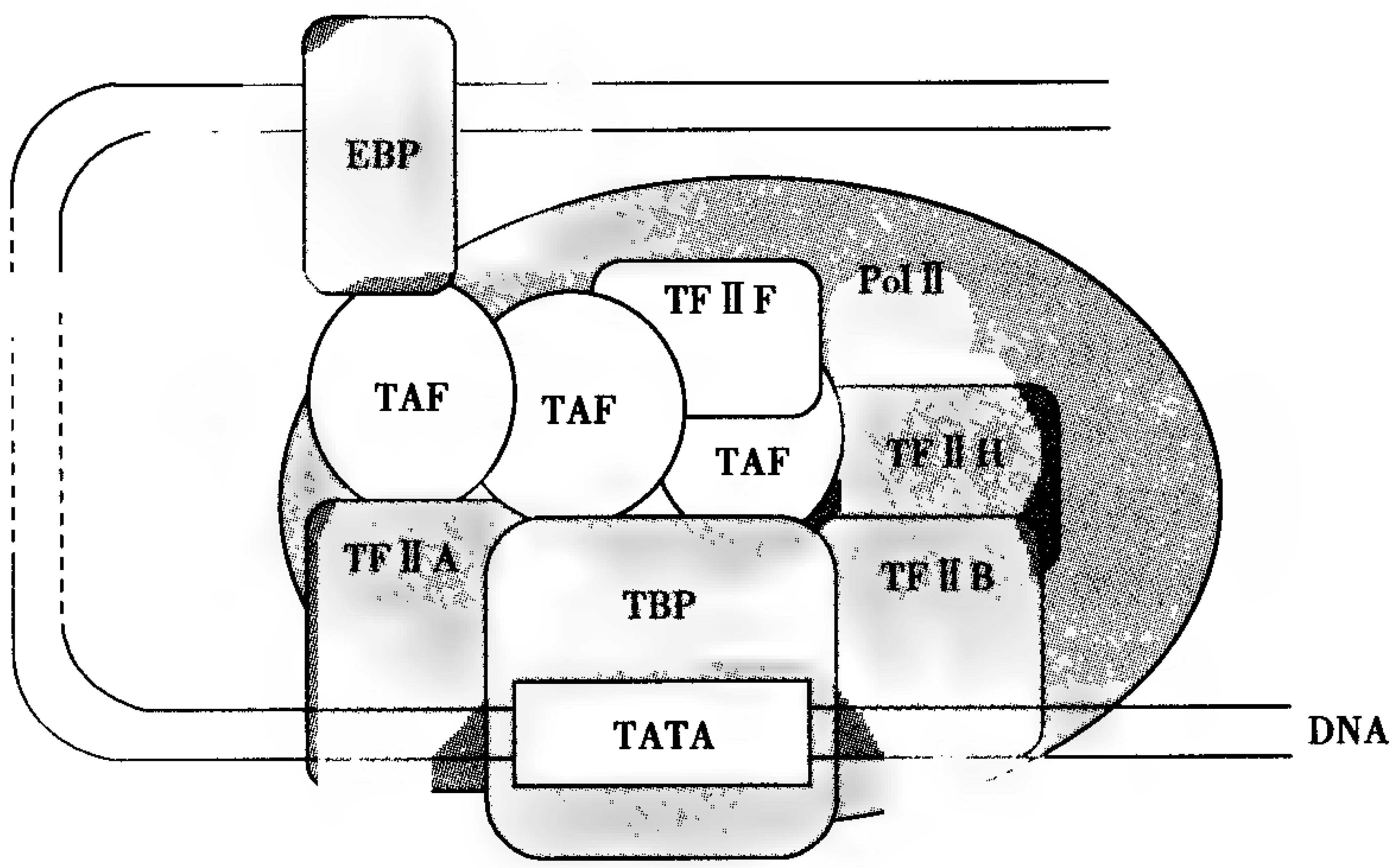
●图 13-8　锌指结构

C=半胱氨酸；H=组氨酸；F=苯丙氨酸；L=亮氨酸；Y=酪氨酸；Zn=锌离子

(三) mRNA 转录激活需要转录起始复合物的形成

真核 RNA 聚合酶Ⅱ不能单独识别、结合启动子，而是先由基本转录因子 TFⅡ D 的组成成分 TBP 识别 TATA 盒或启动元件（initiator，Inr），并有 TAF 参与结合，形成 TF

Ⅱ D-启动子复合物；继而在 TFⅡ A～F 等基本转录因子的参与下，RNA 聚合酶Ⅱ与 TFⅡ D、TFⅡ B 聚合，形成一个功能性的前起始复合物（preinitiation complex，PIC）。在几种基本转录因子中，TFⅡ D 是唯一具有位点特异的 DNA 结合能力的因子，在上述有序的组装过程中起关键性指导作用。这样形成的前起始复合物尚不稳定，也不能有效启动 mRNA 转录。在迂回折叠的 DNA 构象中，结合了增强子的转录激活因子与前起始复合物中的 TBP 接近或通过特异的 TAF 与 TBP 联系，形成稳定的转录起始复合物（图 13-9）。此时，RNA 聚合酶Ⅱ才能真正启动 mRNA 转录。TAF 也是细胞特异的，与转录激活因子共同决定组织特异性转录。



●图 13-9　转录起始复合物的形成
TBP 识别 TATA 盒或启动元件，在 TAF，TFⅡ A～F 等参与下，
与 RNA 聚合酶Ⅱ一起形成转录起始复合物

真核基因转录激活调节是复杂的、多样的。不同的 DNA 元件组合可产生多种类型的转录调节方式；多种转录因子又可结合相同或不同的 DNA 元件。结合 DNA 前，特异转录因子常需通过蛋白质-蛋白质相互作用形成二聚体复合物。组成二聚体的单体不同，所形成的二聚体结合 DNA 的能力不同，对转录激活过程所产生的效果各异，有正性调节或负性调节之分。这样，基因调节元件不同，存在于细胞内的转录因子种类、性质及浓度不同，所发生的 DNA-蛋白质、蛋白质-蛋白质相互作用类型不同，于是便产生协同、竞争或拮抗等不同的调节基因转录激活的方式。

五、RNA Pol Ⅱ转录终止的调节机制尚不清楚

真核细胞转录终止机制所知甚少。在大多数哺乳类动物转录单位，RNA Pol Ⅱ转录终止于 poly-A 添加点以下（3′端）0.5～2kb 范围内的多处可能位点，而不是想象中的在 poly-A 添加点以上。主要是 RNA 链在延伸过程中由于某种机制的作用，使 RNA 聚合酶延伸复合物脱离模板，而不是 RNA 聚合酶指导的 RNA 合成停止。有证据表明一些真核基因及感染细胞中的病毒基因可以靠抗终止方式调节其转录水平。

（一）HIV 基因组转录终止调节

研究 HIV 为了解真核细胞转录终止调节提供了很好的例子。HIV 基因的有效表达需要病毒蛋白 Tat，它是一种抗终止蛋白，可使 RNA Pol Ⅱ通过转录终止点，其作用方式是通过 Tat 与转录产物 5′端特异 RNA 序列结合，并与宿主蛋白质、RNA Pol Ⅱ相互作用，

使延长中的RNA形成一定的二级结构，阻止HIV基因组转录过程的提早终止。HIV的这种抗转录终止机制为人们研究如何抑制HIV病毒的繁殖提供了有意义的启示。

（二）热休克蛋白基因的转录终止调节

真核细胞与原核一样，在环境温度升高或其他应激条件下可做出一系列的反应，包括暂时性停止大多数基因的转录和翻译，启动一套能够提高细胞生存能力的蛋白质即热休克蛋白（heat shock protein，HSP）基因的转录。在果蝇，热休克刺激可使HSP70和其他热休克蛋白的转录在数秒钟内即可由极低水平提高到最高水平。这是因为在热休克时，热休克转录因子（heat shock transcription factor，HSTF）快速地由无活性转变为活性状态。这种类型的调节对基因快速诱导表达极其适用，或许在其他基因的表达调节中也有存在。

六、转录后水平的调节也是基因表达调控的重要环节

对基因转录产物进行的一系列修饰、加工可以归结为转录后水平的基因表达调控。它们可以体现在对mRNA前体hnRNA的剪接和加工；由胞核转至胞质及其定位；mRNA的稳定性；RNA编辑等多个环节进行调控。

（一）hnRNA加工成熟的调节

hnRNA是在核内进行加工修饰的。加工过程包括加帽、加尾、剪接、碱基修饰和编辑等。其中剪接和RNA编辑对某些基因的调节有一定的意义（详见第十一章）。

（二）mRNA运输、胞质内稳定性的调节

RNA无论是在核内进行加工、由胞核运至胞质，还是在胞质内停留（至降解），都是通过与蛋白质结合形成核糖体复合物（ribonucleoprotein，RNP）进行的。mRNA运输、在胞质内的稳定性等均与某些蛋白质成分有关。

所有RNA类型中，mRNA寿命最短。mRNA稳定性是由合成速率和降解速率共同决定的。大多数高等真核细胞mRNA半衰期较原核为长，一般为几个小时。mRNA的半衰期可影响蛋白质合成的量，通过调节某些mRNA的稳定性，即可使相应蛋白质合成量受到一定程度的控制。

运铁蛋白受体（transferrin receptor，TfR）mRNA的降解速率受胞质内某些蛋白质成分的调节，并与mRNA自身结构有关。当细胞内铁足量时，TfR mRNA降解速度加快，致使TfR水平很快下降。当细胞内铁不足时，TfR mRNA稳定性增加，受体蛋白合成增多。TfR mRNA稳定性的调节取决于mRNA分子中特定的重复序列，它位于3′ UTR，称为铁反应元件（iron response element，IRE）。每个IRE大约30bp长，可形成柄-环结构，环上有5个特异的核苷酸，并富含A—U序列。当铁浓度高时，A—U富含序列通过目前尚不得知的机制促进TfR mRNA降解；当铁浓度下降时，一种IRE结合蛋白（IRE-binding protein，IRE-BP）通过识别环的特异序列及柄的二级结构结合IRE。IRE-BP的结合可能破坏了某些机制对TfR mRNA的降解作用，使TfR mRNA的寿命延长。这一发现提示，其他稳定性可调节的mRNA可能也含有与特异蛋白质相互作用的反应元件，致降解速率变慢。

七、基因表达在翻译水平以及翻译后阶段仍然可以受到调节

蛋白质生物合成过程复杂，涉及众多成分。通过调节许多参与成分的作用而使基因表达在翻译水平以及翻译后阶段得到控制。在翻译水平上，目前发现的一些调节点主要在起

始阶段和延长阶段，尤其是起始阶段。如对起始因子活性的调节、Met-tRNA^{met}与小亚基结合的调节、mRNA 与小亚基结合的调节等。其中通过磷酸化作用改变起始因子活性这一点备受关注。mRNA 与小亚基结合的调节对某些 mRNA 的翻译控制也具有重要意义。近年来，小分子 RNA 对基因表达调控的影响成为新的研究热点。

(一) 对翻译起始因子活性的调节主要通过磷酸化修饰进行

蛋白质合成速率的快速变化在很大程度上取决于起始水平，通过磷酸化调节翻译起始因子（eukaryotic initiation factor，eIF）的活性对起始阶段有重要的控制作用。如 eIF-2α 亚单位的磷酸化可阻碍 eIF 的正常运行，从而抑制蛋白质合成的起始。eIF-2α 亚单位的磷酸化由特异性的蛋白激酶催化。在病毒感染的细胞中，细胞抗病毒机制之一即是通过双链 RNA（double-stranded RNA，dsRNA）激活一种蛋白激酶，使 eIF-2α 磷酸化，从而抑制蛋白质合成的起始。

(二) RNA 结合蛋白参与了对翻译起始的调节

所谓 RNA 结合蛋白（RNA binding protein，RBP），是指那些能够与 RNA 特异序列结合的蛋白质。基因表达的许多调节环节都有 RBP 的参与，如前述转录终止、RNA 剪接、RNA 转运、RNA 胞质内稳定性控制以及翻译起始等。铁蛋白相关基因的 mRNA 翻译调节就是 RBP 参与基因表达调控的典型例子。

如前所述，IRE 结合蛋白（IRE-BP）作为特异 RNA 结合蛋白，在调节铁转运蛋白受体（TfR）mRNA 稳定性方面起重要作用。同时，它还能调节另外两个与铁代谢有关的蛋白质的合成，这两种蛋白质是铁蛋白和 δ-氨基-γ-酮戊酸（δ-aminolevulinic acid，ALA）合酶。铁蛋白与铁结合，是体内铁的贮存形式，ALA 合酶是血红素合成的限速酶。与 TfR mRNA 不同，IRE 位于铁蛋白及 ALA 合酶 mRNA 的 5′ UTR，而且无 A—U 富含区，不促进 mRNA 降解。当细胞内铁浓度低时，IRE-BP 处于活化状态，结合 IRE 而阻碍 40S 小亚基与 mRNA5′端起始部位结合，抑制翻译起始；铁浓度偏高时，IRE-BP 不能与 IRE 结合，两种 mRNA 的翻译起始可以进行。

(三) 对翻译产物水平及活性的调节可以快速调控基因表达

新合成蛋白质的半衰期长短是决定蛋白质生物学功能的重要影响因素。因此，通过对新生肽链的水解和运输，可以控制蛋白质的浓度在特定的部位或亚细胞器保持在合适的水平。此外，许多蛋白质需要在合成后经过特定的修饰才具有功能活性。通过对蛋白质的可逆的磷酸化、甲基化、酰基化修饰，可以达到调节蛋白质功能的作用，是基因表达的快速调节方式。

(四) 小分子 RNA 对基因表达的调节十分复杂

与原核基因表达调节一样，某些小分子 RNA 也可调节真核基因表达。这些 RNA 都是非编码 RNA（non-coding RNA，ncRNA）。除了我们在前几章谈到过的具有催化活性的 RNA（核酶）、细胞核小分子 RNA（snRNA）以及核仁小分子 RNA（snoRNA）以外，目前人们广泛关注的非编码 RNA 有：微小 RNA（microRNA，miRNA）和小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）。细胞内存在的小分子 RNA 种类繁多，功能多样，由此产生了 RNA 组学（RNomics）概念，即研究细胞内所有小分子 RNA 的种类、结构和功能。

1. 微小 RNA 微小 RNA（miRNA）是一大家族小分子非编码单链 RNA，长度约 20～25 个碱基，由一段具有发夹环结构，长度为 70～90 个碱基的单链 RNA 前体（pre-miRNA）经 Dicer 酶剪切后形成。这些成熟的 miRNA 与其他蛋白质一起组成 RNA 诱导的沉默复合体（RNA-induced silencing complex，RISC），通过与其靶 mRNA 分子的 3′端

非编码区域（3′-untranslatedregion，3′ UTR）互补匹配，再以目前尚不清楚的机制抑制该 mRNA 分子的翻译。最早被确认的 miRNA 是 1993 年在线虫中发现的 *lin*-4。这种单链 RNA 的表达具有阶段性，通过碱基配对的方式结合到靶 mRNA *lin*-14 的 3′ UTR，从而抑制 *lin*-14 的翻译，但并不影响其转录。2000 年，另一个促进线虫幼虫向成虫转变的基因 *let*-7 被发现，它的转录产物为 21 个碱基 RNA 分子，也具有明显的阶段表达特异性，对线虫的发育具有重要的调控作用。miRNA 具有一些鲜明的特点：①其长度一般为 20～25 个碱基，个别也有 20 个碱基以下的报道。②在不同生物体中普遍存在，包括线虫、果蝇、家鼠、人及植物等。③其序列在不同生物中具有一定的保守性，但是尚未发现动植物之间具有完全一致的 miRNA 序列。④具有明显的表达阶段特异性和组织特异性。⑤miRNA 基因以单拷贝、多拷贝或基因簇等多种形式存在于基因组中，而且绝大部分位于基因间隔区。miRNA 的广泛性和多样性提示它们可能具有非常重要的生物学功能。

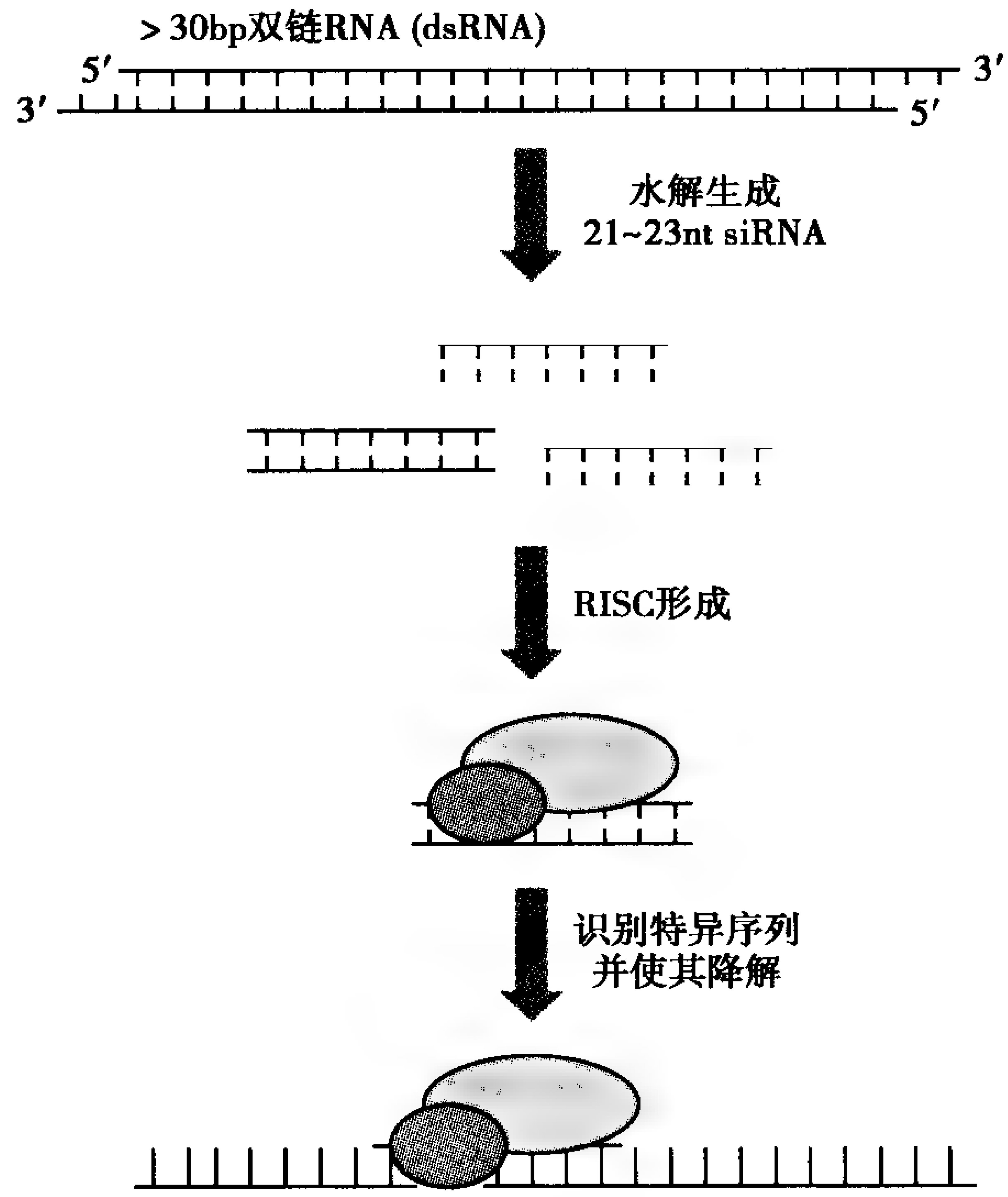
2. 小干扰 RNA　小干扰 RNA（siRNA）是细胞内一类双链 RNA（double-stranded RNA，dsRNA）在特定情况下通过一定酶切机制，转变为具有特定长度（21～23 个碱基）和特定序列的小片段 RNA。双链 siRNA 参与 RISC 组成，与特异的靶 mRNA 完全互补结合，导致靶 mRNA 降解，阻断翻译过程。这种由 siRNA 介导的基因表达抑制作用被称为 RNA 干涉（RNA interference，RNAi）(图 13-10)。RNAi 实际上是通过降解特异 mRNA、在转录后水平发生的一种基因表达调节机制，是生物体本身固有的一种对抗外源基因侵害的自我保护现象。它能识别、清除外源 dsRNA 或同源单链 RNA，提供了一种防御外源核酸入侵的保护措施。同时，由于外源 dsRNA 导入细胞后也可以引起与 dsRNA 同源的 mRNA 降解，进而抑制其相应的基因表达，RNAi 又被作为一种新技术广泛应用于功能基因组研究中。通常认为，siRNA 及其介导的 RNAi 具有很高的特异性，但也有报道显示 siRNA 序列中一个或几个碱基的改变并不影响 siRNA 的活性。

RNA 干扰现象的发现

科学家们最早在植物中发现了 dsRNA 诱导的 RNA 沉默现象。1995 年，Guo 和 Kemphues 在线虫中利用反义 RNA 技术特异性地阻断 par-1 基因表达的同时，在对照实验中给线虫注射正义 RNA 以期观察到基因表达的增强。但发现两者都同样抑制了 par-1 基因的表达。A. Fire 和 C. C. Mello 等后来通过实验阐明了这一反常现象：将反义 RNA 和正义 RNA 同时注射到秀丽隐杆线虫（Caenorhabditis elegans）比单独注射反义 RNA 或正义 RNA 能够更有效地诱导基因沉默。由此推断，反义 RNA 和正义 RNA 形成的 dsRNA 触发了高效的基因沉默机制并极大降低了靶 mRNA 水平。这一现象被称为 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）。1998 年，他们将其研究成果发表在《Nature》上。这一发现揭示了双链 RNA 基因剪切的原理。为此，A. Fire 和 C. C. Mello 荣获 2006 年度诺贝尔生理医学奖。

siRNA 和 miRNA 都属于非编码小分子 RNA，它们具有一些共同的特点：均由 Dicer 切割产生；长度都在 22 个碱基左右；都与 RISC 形成复合体，与 mRNA 作用而引起基因沉默。它们之间的差异见表 13-2。

总而言之，基因表达与调控是一个极其复杂的过程，随着研究的进展，将有更多的有效方法被应用于基因表达调控的研究，使之得到更丰硕的成果。目前“组学”研究思路与方法也已应用于基因表达调控的研究。



●图 13-10　RNA 干扰作用机制
双链 RNA 分子被水解为 21～23 个碱基对的小分子干扰 RNA (siRNA)，siRNA 与一些蛋白质形成 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC)，并通过碱基互补与特异的 mRNA 结合使其降解

表 13-2　siRNA 和 miRNA 的差异比较

	siRNA	miRNA
前体	内源或外源长双链 RNA 诱导产生	内源发夹环结构的转录产物
结构	双链分子	单链分子
功能	降解 mRNA	阻遏其翻译
靶 mRNA 结合	需完全互补	不需完全互补
生物学效应	抑制转座子活性和病毒感染	发育过程的调节

自基因组学（genomics）于 1986 年被首次提出，到 1990 年人类基因组计划的启动，至 2001 年公布人类基因组图谱及初步分析结果，基因组学所含内容已经非常广泛。它不仅包括了“人类基因组计划”和部分“生物信息学”的内容，而且还派生出了功能基因组学中的“转录组学”和“蛋白质组学”，以及人们提出的“RNA 组学”、“代谢组学”和“糖组学”等等。

从上述内容中我们可以看到，蛋白质特别是组蛋白的修饰对基因表达调控的影响虽然是显而易见，但是真正的作用机制仍有待于揭示。长久以来，人们一直关注着编码 RNA，却突然发现非编码 RNA 也有着重要的作用。因此，全面了解非编码 RNA 的时空表达谱及生物学意义的“RNA 组学”应运而生。人们也只有在对核酸（DNA 和 RNA）和蛋白质进行了全面深入的研究之后，才有可能破解生命之谜。

小　　结

基因表达就是基因转录及翻译的过程。基因表达表现为严格的规律性，即时间、空间特异性。基因表达的时间、空间特异性由特异基因的启动子（序列）和（或）增强子与调节蛋白相互作用决定。基因表达的方式有组成性表达及诱导或阻遏区分。某些基因产物对生命全过程都是必需的或必不可少的。这类基因在一个生物个体的几乎所有细胞中持续表达，称为管家基因；管家基因表达方式称基本的或组成性基因表达。另有一些基因表达随外环境信号变化：有些基因对环境信号应答时被激活，基因表达产物增加，这种基因表达方式称为诱导；有些基因对环境信号应答时被抑制，基因表达产物水平降低，这种基因表达方式称为阻遏。原核生物、单细胞生物调节基因的表达是为适应营养环境变化，维持生长和细胞分裂。多细胞生物调节基因的表达除为适应环境，还有维持组织器官分化、个体发育的功能。基因表达调控是在多级水平上进行的复杂事件。其中，转录起始是基因表达的基本控制点。基因转录激活调节基本要素涉及 DNA 序列、调节蛋白以及这些因素对 RNA 聚合酶活性的影响。除了转录起始水平的调节，其他水平，如基因激活、转录后加工、翻译及翻译后加工对原核及真核生物的基因表达均有调节作用。

大多数原核基因调控是通过操纵子机制实现的。*E. coli* 的 *lac* 操纵子含 Z、Y 及 A 三个结构基因，还有包括一个阻遏蛋白结合位点 O 序列、一个启动序列 P 在内的调控区，以及一个调节基因 I。I 基因与 *lac* 操纵区相邻，编码一种 Lac 阻遏蛋白。阻遏蛋白、分解代谢物基因激活蛋白（CAP）与调控区结合位点的结合调节着操纵子基因的转录。

真核基因表达调控的某些机制与原核存在明显差别。包括：真核细胞内含有多种 RNA 聚合酶；处于转录激活状态的染色质结构会发生明显变化，如对核酸酶敏感，DNA 碱基的甲基化修饰，组蛋白的乙酰化、甲基化或磷酸化修饰等。此外，微小 RNA 对真核基因表达调控的影响也日益受到重视。

真核基因转录激活受顺式作用元件与反式作用因子相互作用调节。真核基因顺式作用元件按功能特性分为启动子、增强子及沉默子。真核基因启动子就是决定 RNA 聚合酶转录起始位点的 DNA 序列。增强子是远离转录起始点、决定基因的时间、空间特异性表达、增强启动子转录活性的 DNA 序列，其发挥作用的方式通常与方向、距离无关。反式作用蛋白（又称反式作用因子）就是指（真核）转录调节因子，简称转录因子（TF），可分为基本转录因子和特异转录因子。基本转录因子是 RNA 聚合酶结合启动子所必需的一组蛋白因子，决定三种 RNA（tRNA、mRNA 及 rRNA）转录的类别。特异转录因子通过结合它的调节序列激活或阻遏特异基因的转录。所有基因的转录调节都涉及包括 RNA 聚合酶在内的转录起始复合物的形成。

（周春燕　贾弘禔）

第十四章　基因重组与基因工程

DNA 克隆、测序与重组技术的历史

在 20 世纪 70 年代，许多 DNA 新技术的发展使得基因分离和操作取得了巨大成就。1973 年，S. Cohen 等人首次获得体外重组 DNA 的分子克隆（很多 DNA 分子的“拷贝”）。1977 年，A. Maxam 和 W. Gilbert 的化学裂解（chemical cleavage）DNA 测序问世；不久，Sanger 及其同事又提出了另一种 DNA 序列分析技术——双脱氧测序法（dideoxy sequencing or dideoxy method）。在 DNA 克隆和测序技术基础上，重组 DNA 技术即基因工程技术日臻完善，为 20 世纪 90 年代启动人类基因组计划（human genome project，HGP）奠定了基础。如今，重组 DNA 技术已被广泛应用于基因修饰和改造、克隆动物、培育抗病植物、开发新药及临床诊断。同时，重组 DNA 技术也是分子遗传学、分子生物学、分子医学等很多当代生命学科发展、融合的桥梁；这些学科的融合、发展又促进了重组 DNA 技术的成熟，使其发展为一个专门学科——重组 DNA 技术学（recombinant DNA technology）。

当噬菌体或病毒感染宿主细胞时，外源 DNA 与宿主 DNA 经常通过相互作用而发生重组或“整合”(integration)。在适宜条件下，整合的外源 DNA 又可被切除、包装成新的病毒颗粒而释放；当切除不是那么准确时，就有可能使病毒携带有部分宿主 DNA。新的病毒再次感染宿主时，就可能将携带的宿主 DNA 转移给另一细胞，这就是自然界发生的基因转移。无论是原核生物细胞还是真核生物细胞在增殖、分裂、分化过程也经常发生基因重组或重排（rearrangement）。自然界发生的这些重组不仅对基因转录激活功能产生影响，同时对研究生物进化、人工基因重组技术发明有重要启示。

DNA 克隆和测序技术相结合，使当代科学家可以从数千个、甚至数万个基因中分离、鉴定某一特定基因，并且可使任一基因在一定的受体细胞或宿主体内表达具有生物学功能的蛋白质。

第一节　自然界 DNA 重组和基因转移是经常发生的

DNA 作为遗传物质，具有保守性、变异性和流动性。自然界不同物种或个体之间的 DNA 重组和基因转移是经常发生的，它是基因变异和物种演变、生物进化的基础。人类在进行基因克隆、基因治疗等科学实验和实践中所进行的人工基因操作的过程就是重组 DNA 技术。自然界的 DNA 重组增加了群体的遗传多样性，通过优化组合积累了有意义的遗传信息，并且参与了许多重要的生物学过程，如 DNA 损伤后的修复。DNA 重组包括同源重组（homologous recombination）、特异位点重组（site specific recombination）和转座重组（transpositional recombination）等类型。

一、同源重组是最基本的 DNA 重组方式

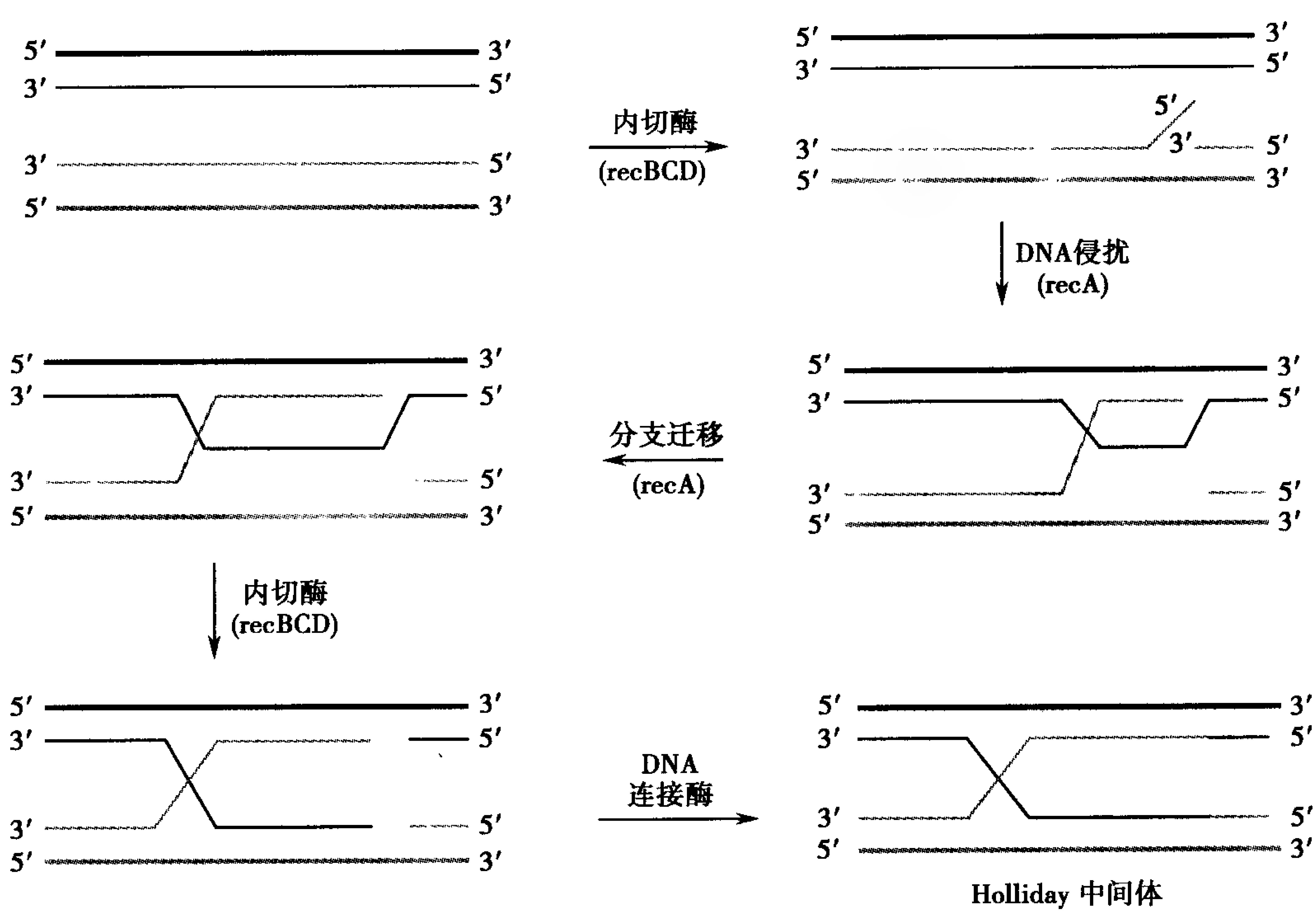
作为最基本的 DNA 重组方式，同源重组（homologous recombination）是指发生在同

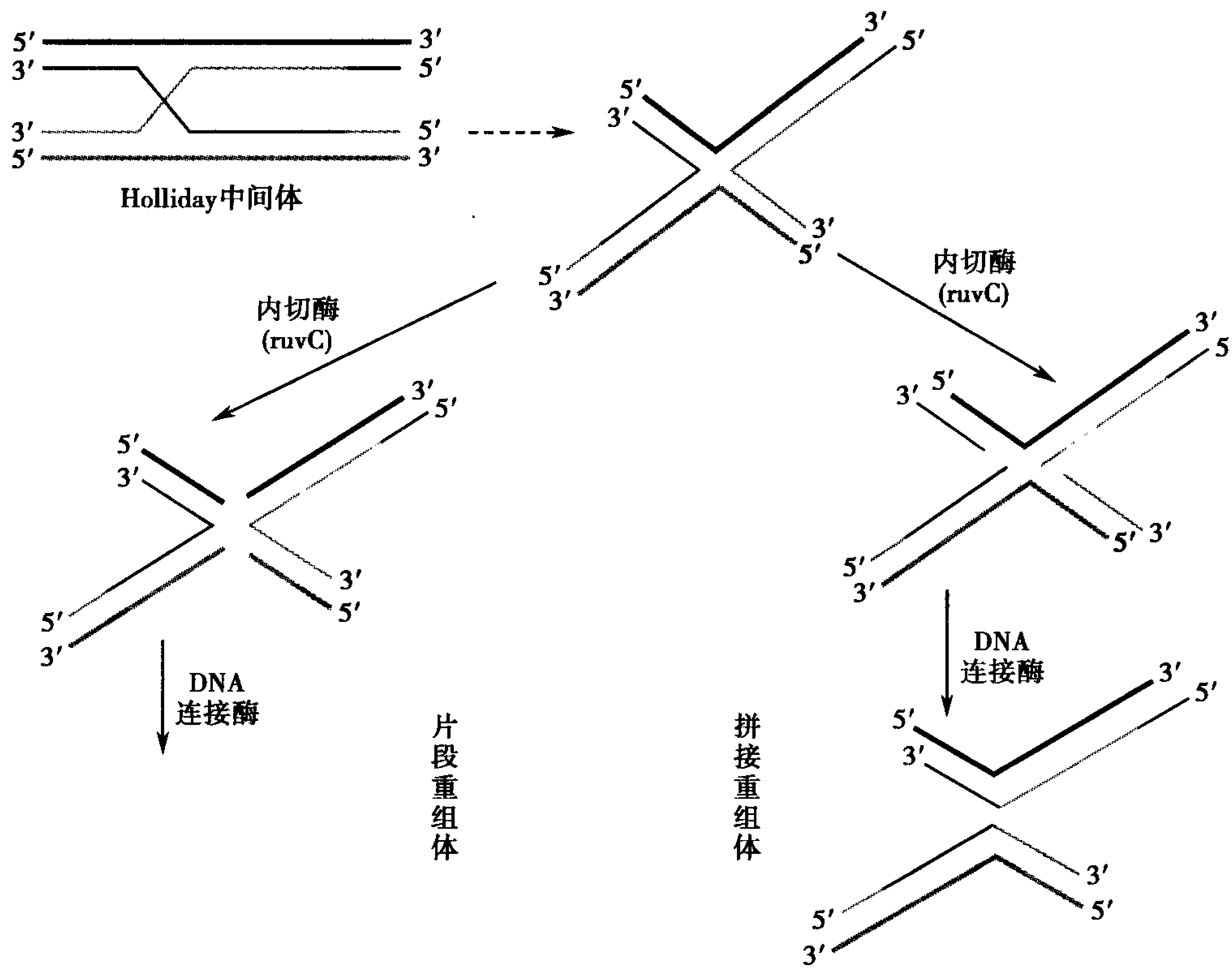
源序列间的重组，它通过链的断裂和再连接，在两个 DNA 分子同源序列间进行单链或双链片段的交换，又称基本重组（general recombination）。

同源重组不需要特异 DNA 序列，而是依赖两分子之间序列的相同或类似性。如果通过转化或转导获得的外源 DNA 与宿主 DNA 充分同源，那么外源 DNA 就可以整合进宿主的染色体。R. Holliday 于 1964 年提出一个 Holliday 模型，对于认识同源重组起着十分重要的作用。在这一模型中，同源重组主要经历四个关键步骤：①两个同源染色体 DNA 排列整齐；②一个 DNA 的一条链断裂、并与另一个 DNA 对应的链连接，形成 Holliday 中间体（intermediate）；③通过分支移动（branch migration）产生异源双链（heteroduplex）DNA；④Holliday 中间体切开并修复，形成两个双链重组体 DNA。切开的方式不同，所得到的重组产物也不同。如果切开的链与原来断裂的是同一条链（见 Holliday 模型左边的产物，图 14-1），重组体含有一段异源双链区，其两侧来自同一亲本 DNA，称为片段重组体（patch recombinant）。但如切开的链并非原来断裂的链（模型右边产物），重组体异源双链区的两侧来自不同亲本 DNA，称为拼接重组体（splice recombinant）。

目前对 *E. coli* 的同源重组分子机制了解最清楚。参与细菌 DNA 同源重组的酶有数十种，其中许多酶和辅助因子与 DNA 复制和修复是共用的。最关键的是 RecA 蛋白，可结合单链 DNA（single stranded DNA，ssDNA）、形成 RecA-ssDNA 复合物。在有重复 DNA 存在时，此复合物可与含有同源序列的靶双链 DNA 相互作用，将结合的单链 DNA 插入双链 DNA 的同源区，与互补链配对，而将同源链置换出来。RecBCD 复合物具有三种酶活性：依赖于 ATP 的核酸外切酶，可被 ATP 增强的核酸内切酶以及需要 ATP 的解螺旋酶。它遇到 CHI 位点（5′GCTGGTGG3′）可在其下游切出 3′末端的游离单链。RuvC 可切开同源重组的中间体。*E. coli* 的同源重组过程大致如下（图 14-1）：

RecBCD 复合物使 DNA 产生单链切口；RecA 蛋白催化单链 DNA 对另一双链 DNA 的侵入，并与其中的一条链交叉，交叉分支移动，待相交的另一链在 RecBCD 内切酶活性催化下断裂后，由 DNA 连接酶交换连接缺失的远末端，形成 Holliday 中间体；此中间体





● 图 14-1　同源重组机制

再经内切酶 RuvC 切割、DNA 连接酶的作用完成重组。同源重组在原核、真核生物都有发生。

二、细菌的基因转移与重组有四种方式

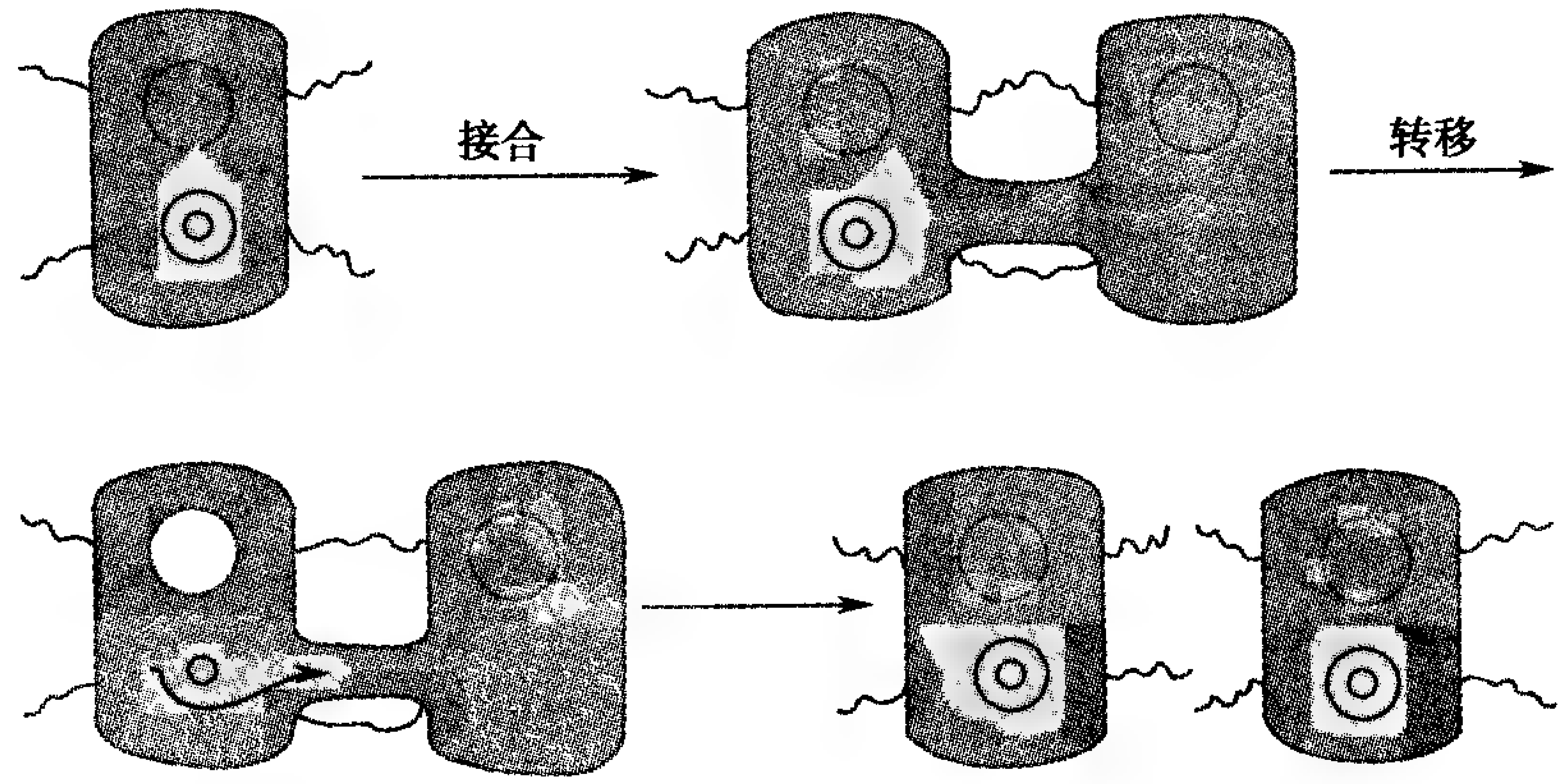
细菌中，可以通过接合、转化、转导和细胞融合四种方式，在不同 DNA 分子间发生共价连接，亦即基因转移；并通过基因重组以适应随时改变的环境，其中，如外来基因与内在基因部分同源，此基因重组即为同源重组。

（一）接合作用

当细胞或细菌通过菌毛相互接触时，质粒 DNA（见本章第二节）就可从一个细胞（细菌）转移至另一细胞（细菌），这种类型的 DNA 转移称为接合作用（conjugation）。并非任何质粒 DNA 都有这种转移能力，只有某些较大的质粒，如 F 因子（F factor）方可通过接合作用从一个细胞转移至另一个细胞。F 因子含细菌性鞭毛蛋白编码基因，决定细菌表面性鞭毛的形成。当含有 F 因子的细菌（F^+ 细胞）与没有 F 因子的细菌（F^- 细胞）相遇时，性鞭毛连接就会在两细胞间形成，接着质粒双链 DNA 中的一条链就会被酶切割，产生单链缺口，切口单链 DNA 通过鞭毛连接桥向 F^- 细胞转移。随后，在两细胞内分别以单链 DNA 为模板合成互补链（图 14-2）。

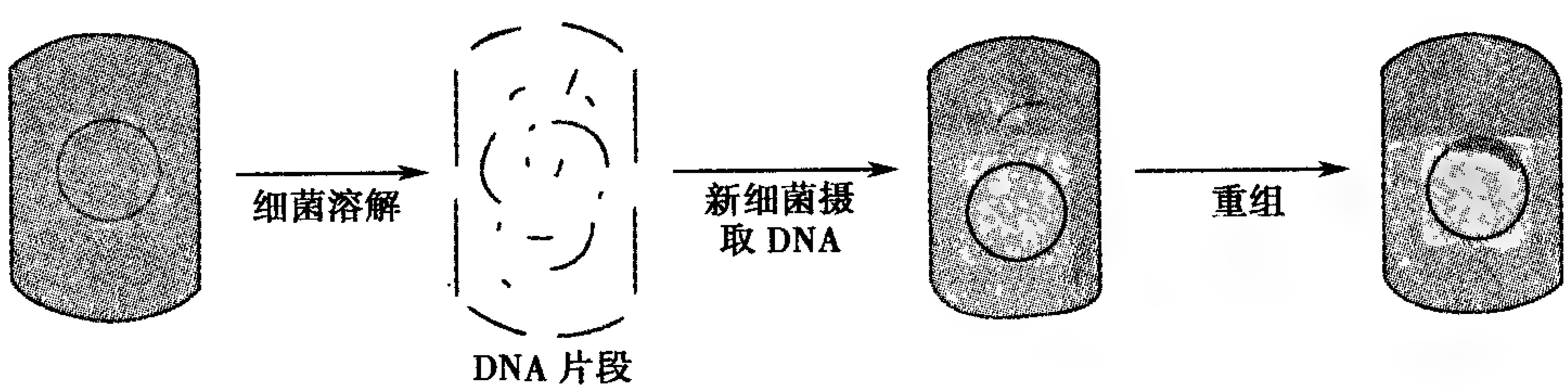
（二）转化作用

通过自动获取或人为地供给外源 DNA，使细胞或培养的受体细胞获得新的遗传表型，这就是转化作用（transformation）。例如，当溶菌时，裂解的 DNA 片段作为外源 DNA 被另一细菌摄取，并通过重组机制将外源 DNA 整合进基因组，受体菌就会获得新的遗传性



●图 14-2　接合作用

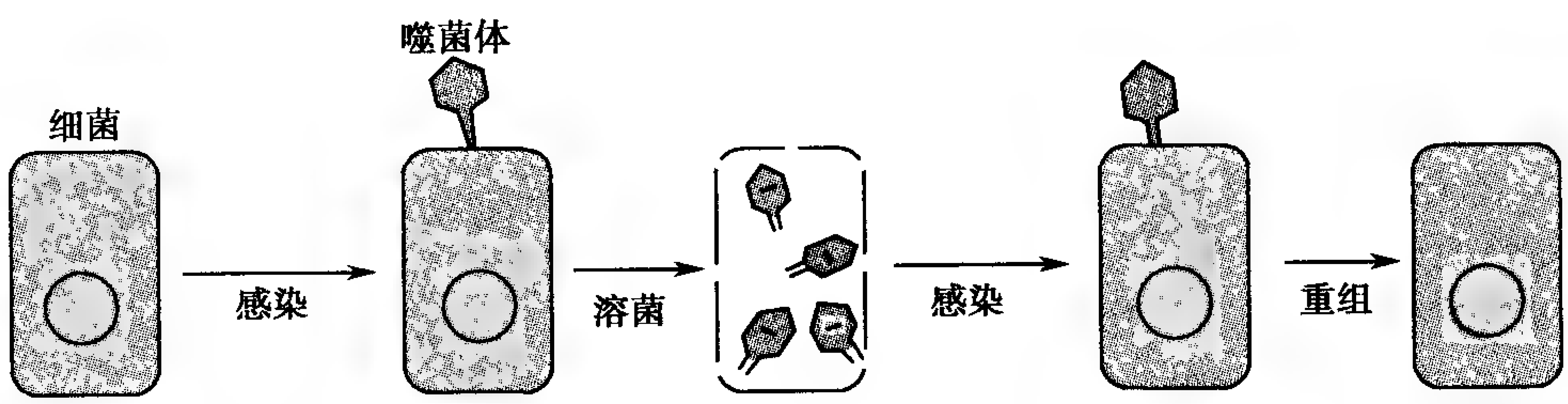
状，这就是自然界发生的转化作用（图 14-3）。但是，由于较大的外源 DNA 不易透过细胞膜，因此自然界发生的转化作用效率并不高，染色体整合几率则更低。



●图 14-3　转化作用

(三) 转导作用

当病毒从被感染的细胞（供体）释放出来、再次感染另一细胞（受体）时，发生在供体细胞与受体细胞之间的 DNA 转移及基因重组即为转导作用（transduction）。自然界常见的例子就是由噬菌体感染宿主时伴随发生的基因转移（图 14-4）。



●图 14-4　转导作用

当噬菌体感染宿主时会有两种结局：一种是噬菌体 DNA 在宿主菌内迅速增殖，产生新的病毒颗粒，并溶解细菌、释放出新生噬菌体，这就是所谓的溶菌生长途径（lysis pathway）；另一种是噬菌体 DNA 整合进宿主染色体，随宿主 DNA 复制而被动复制，这就是溶源菌生长途径（lysogenic pathway）。在溶源菌生长方式中，噬菌体（此时称原噬菌体）与宿主菌（称溶源菌）"和平共处"可维持无数代，直到宿主遭遇特殊事件（如 DNA 损伤诱发 SOS 反应），使原噬菌体 DNA 从细菌染色体上被切下，进入溶菌途径。当原噬菌体 DNA 被从细菌染色体上切除时，如果有部分宿主 DNA 被随着切下，新生的噬菌体在下次感染细菌时就可能将前一宿主 DNA 转移至新的宿主细胞，发生转导作用。

三、特异位点重组，即特异位点间发生的整合

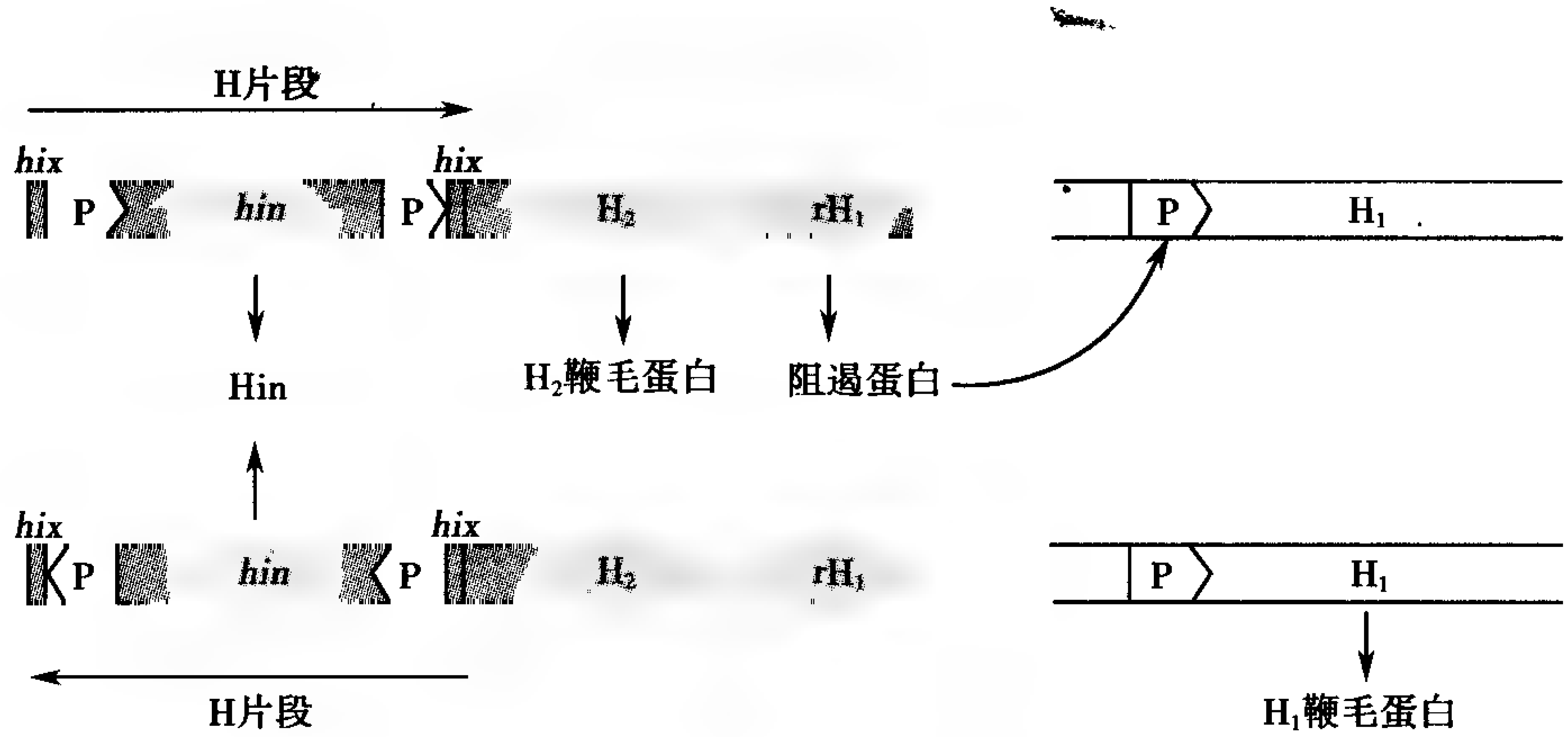
由整合酶催化，在两个 DNA 序列的特异位点间发生的整合称位点特异的重组（site specific recombination）。例如，λ 噬菌体 DNA 的整合、细菌的特异位点重组、免疫球蛋白基因的重排以及转座重组等。特异位点重组广泛存在于各类细胞中，起着十分重要的作用。它们的作用包括某些基因表达的调节，发育过程中程序性 DNA 重排，以及有些病毒和质粒 DNA 复制循环过程中发生的整合与切除等。

（一）λ 噬菌体 DNA 的整合

λ 噬菌体的整合酶识别噬菌体 DNA 和宿主染色体的特异靶位点，而后发生选择性整合。噬菌体的重组位点 att P 与大肠杆菌的重组位点 att B 之间有 15bp 核心序列相同，在整合酶（Int）、整合宿主因子（IHF）作用下发生整合；切除还需 Xis 蛋白的参与。通常，这种由整合酶催化的整合是十分特异而有效的。反转录病毒整合酶可特异地识别、整合反转录病毒 cDNA 的长末端重复序列（long terminal repeat，LTR）。

（二）细菌的特异位点重组

鼠伤寒沙门杆菌（Salmonella typhimurium）由鞭毛蛋白决定的 H 抗原有两种，分别为 H_1 鞭毛蛋白和 H_2 鞭毛蛋白。在单菌落的沙门氏菌中经常出现少数呈另一 H 抗原的细菌，这种现象称为鞭毛相转变（phase variation）。遗传分析表明，这种抗原相位的改变是由一段 995bp 的 DNA——H 片段（H segment），发生倒位所致。H 片段的两端为 14bp 特异重组位点（hix），其方向相反，发生重组后可使 H 片段倒位。H 片段上有两个启动子（P），其一驱动 hin 基因表达；另一取向与 H_2 和 rH_1 基因一致时驱动这两基因表达，倒位后 H_2 和 rH_1 基因不表达。hin 基因编码特异的重组酶，即倒位酶（invertase）Hin。该酶为 22000 亚基的二聚体，分别结合在两个 hix 位点上，并由辅助因子 Fis（factor for inversion stimulation）促使 DNA 弯曲而将两 hix 位点联结在一起，DNA 片段经断裂和再连接而发生倒位。rH_1 表达产物为 H_1 阻遏蛋白，当 H_2 基因表达时，H_1 基因被阻遏；反之，H_2 基因不表达时，H_1 基因才得以表达（图 14-5）。



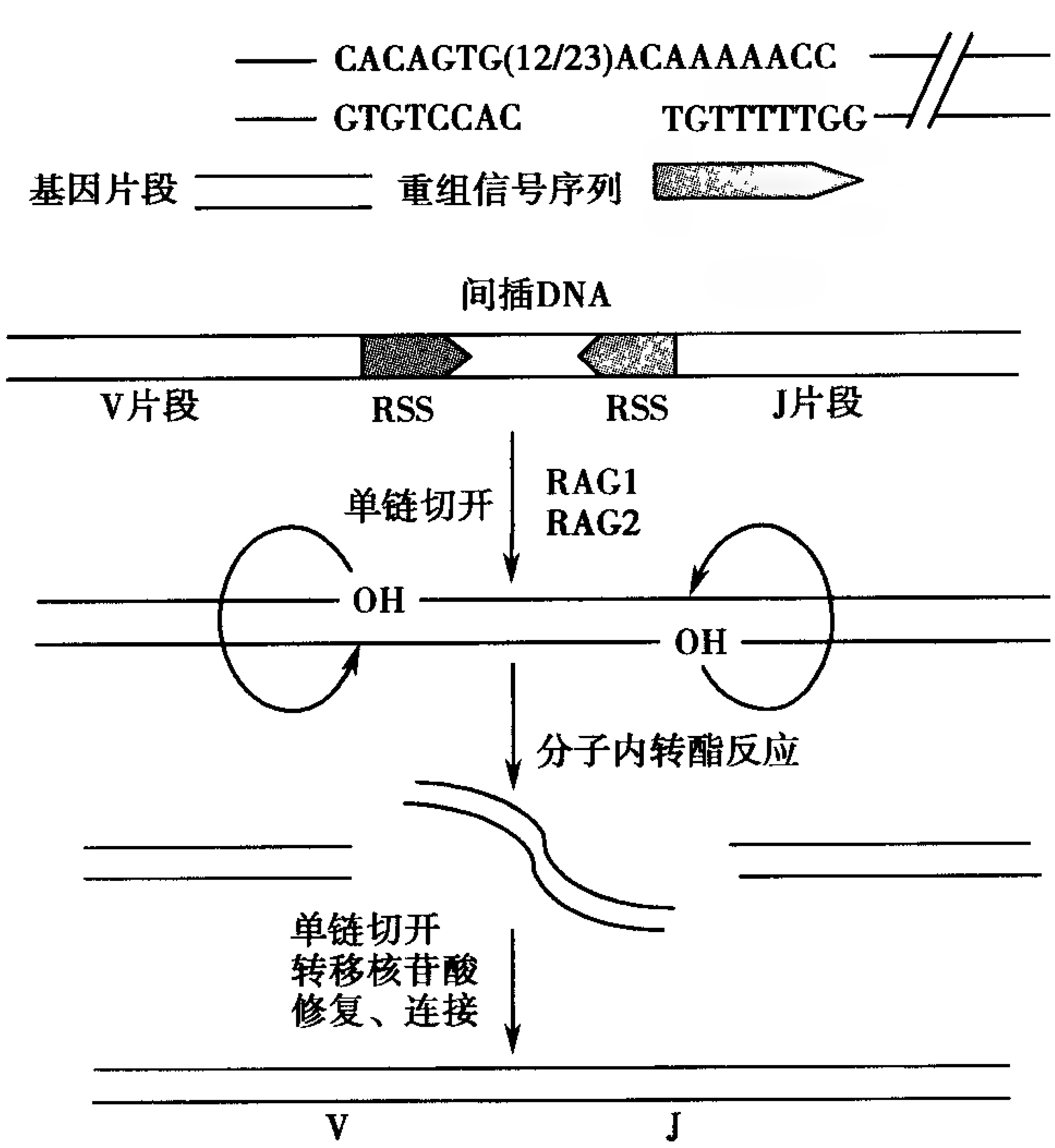
●图 14-5 沙门菌 H 片段倒位决定鞭毛相转变

hix 为 14bp 的反向重复序列，它们之间的 H 片段可在 Hin 控制下进行特异位点重组（倒位）。H 片段上有两个启动子，其一驱动 hin 基因表达，另一正向时驱动 H_2 和 rH_1 基因表达，反向（倒位）时 H_2 和 rH_1 不表达。rH_1 为 H_1 阻遏蛋白基因，P 代表启动子。

（三）免疫球蛋白基因的重排

抗体分子免疫球蛋白（Ig），由两条轻链（L链）和两条重链（H链）组成，它们分别由三个独立的基因族（gene family）编码，其中两个编码轻链（κ和λ），一个编码重链。决定轻链的基因族上分别有L、V、J、C四类基因片段。L代表前导片段（leader segment），V代表可变片段（variable segment），J代表连接片段（joining segment），C代表恒定片段（constant segment）。决定重链的基因族上共有L、V、D、J、C五类基因片段，其中D代表多样性片段（diversity segment）。

重链（IgH）基因的V-D J重排和轻链（IgL）基因的V-J重排均发生在特异位点上。在V片段的下游，J片段的上游以及D片段的两侧均存在保守的重组信号序列（recombination signal sequence，RSS）。该信号序列都由一个共同的回文七核苷酸序列（CACAGTG）和一个共同的富含A的九核苷酸序列（ACAAAAACC），中间为固定长度的间隔序列。此重排的重组酶基因rag（recombination activating gene）共有两个，分别产生蛋白质RAG1和RAG2。RAG1识别信号序列，然后RAG2加入复合物，九核苷酸序列提供最初的识别位点，七核苷酸序列为切割位点。抗体基因片段的连接过程如图14-6所示。



●图14-6　免疫球蛋白基因重排过程

抗体重链和轻链基因重排后转录成初级mRNA前体，经加工修饰产生成熟的mRNA并翻译成免疫球蛋白。第二次重排发生在成熟B细胞经抗原刺激后，这次重排出现重链基因改变恒定区，即类型转换，其抗原特异性不变。B细胞分化至此称为浆细胞，它的特点是可以大量分泌抗体，并且是单特异性的抗体。

T淋巴细胞的受体有两类，一类是αβ受体，一类是γδ受体，只存在于缺失α、β链的T细胞和发育早期的T细胞；αβ受体出现于成熟的T细胞，是主要的T细胞受体。它们的基因重排与抗体基因重排十分类似，也存在β链与γ链的V-D-J连接和α链与δ链的V-J连接。

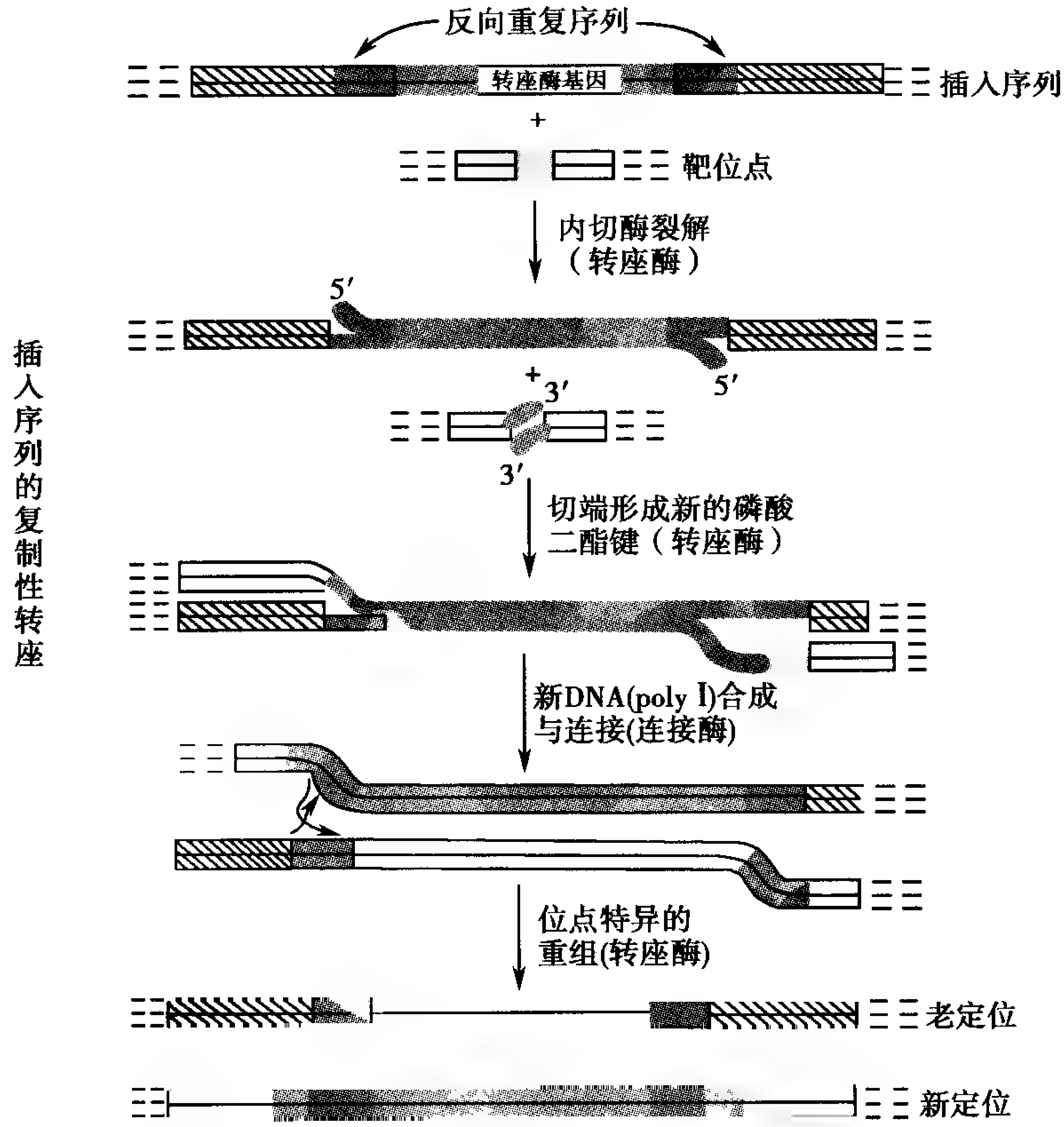
四、转座重组

大多数基因在基因组内的位置是固定的，但有些基因可以从一个位置移动到另一位置。这些可移动的DNA序列包括插入序列和转座子。由插入序列和转座子介导的基因移位或重排称为转座（transposition）。转座的确切机制目前尚不十分清楚。这里仅简单介绍插入序列和转座子的概念。

（一）插入序列转座

典型的插入序列（insertion sequences，IS）是长750～1500bp的DNA片段，其中包括两个分离的、由9～41bp构成的反向重复序列（inverted repeats）及一个转座酶（transposase）编码基因，后者的表达产物可引起转座（transposition）。反向重复序列的侧翼连接有短的（4～12bp）、不同的插入序列所特有的正向重复序列。插入序列发生的转

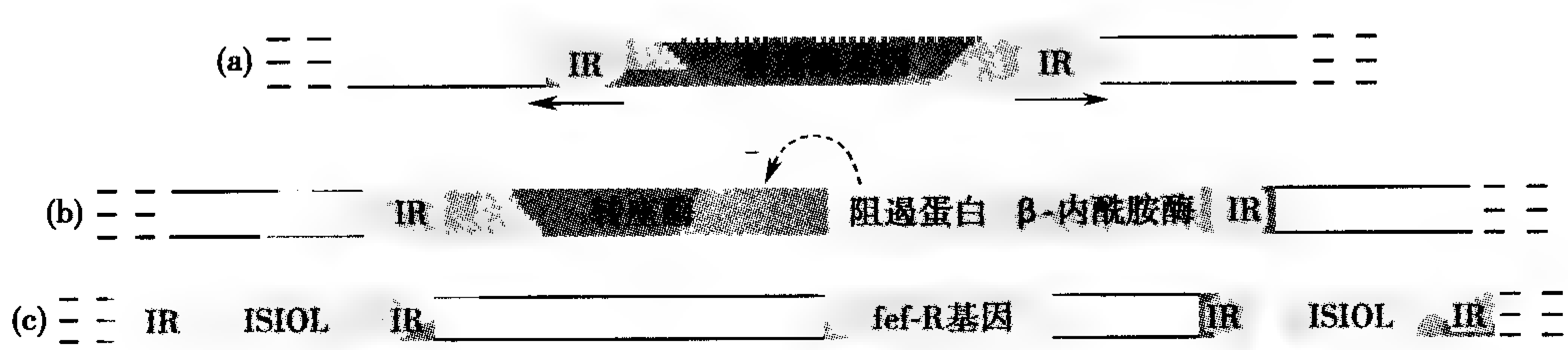
座有两种形式：保守性转座（conservative transposition）是插入序列从原位迁至新位；复制性转座（duplicative transposition）是插入序列复制后，其中的一个复制本迁移至新位，另一个仍保留在原位（图 14-7）。



● 图 14-7　插入序列的复制性转座

（二）转座子转座

转座子（transposon）就是可从一个染色体位点转移至另一位点分散的重复序列，也就是一段可以发生转座（transposition）的 DNA。早在 20 世纪 50 年代初，美国遗传学家 McClintock 在研究玉米的遗传因子时发现，某些基因活性受到一些能在不同染色体间转移的控制因子（controlling element）影响。这一发现与当时传统的遗传学观点相抵触，因而不被学术界所普遍接受。直到 20 世纪 60 年代后期，美国青年细菌学家 J. Shapiro 在大肠杆菌中发现一种由插入序列（insertion sequence，IS）所引起的多效突变，之后又在不



● 图 14-8　细菌的可流动性元件

(a) 插入序列：转座酶编码基因两侧连接反向末端重复序列（箭头所示）；(b) 转座子 Tn3：含有转座酶、β-内酰胺酶及阻遏蛋白编码基因；(c) 转座子 Tn10：含四环素抗性基因及两个相同的插入序列 IS10L

同实验室发现一系列可转移的抗药性转座子，才重新引起人们重视。1983 年 McClintock 被授予诺贝尔生理学与医学奖，距离她公布玉米控制因子的时间已有 32 年之久。与插入序列类似，转座子也是以两个反向重复序列为侧翼序列，并含有转座酶基因；与插入序列不同的是，它们含有抗生素抗性等有用的基因。在很多转座子中，它的侧翼序列本身就是插入序列（图 14-8）。

第二节　重组 DNA 技术，又称 DNA 克隆或分子克隆

G. Mendel 的豌豆杂交实验（1865 年），O. T Avery 等的肺炎球菌转化实验（1944 年）说明，人类完全可能改变一个生物个体的遗传性状。继克隆基因、转基因动物超级小鼠等诞生之后，英国罗斯林研究所成功地“克隆”了“多莉”羊（1997 年 2 月），进一步证明了人类操作基因的能力。所有这些成就都是以重组 DNA 技术为基础的。重组 DNA 技术即基因工程，是对携带遗传信息的分子进行设计和改造的分子工程，包括基因重组、克隆和表达。1996 年，以重组 DNA 技术生产的促红细胞生成素产值逾十亿美元，所有这一切都说明重组 DNA 技术对人类生活和健康的影响是巨大的。

一、重组 DNA 技术相关概念

（一）DNA 克隆

所谓克隆（clone）就是来自同一始祖的相同副本或拷贝（copy）的集合；获取同一拷贝的过程称为克隆化（cloning），也就是无性繁殖。通过无性繁殖过程获得的“克隆”，可以是分子的，也可以是细胞的、动物的或植物的。在分子遗传学领域所谓的分子克隆（molecular clone）专指 DNA 克隆。

DNA 克隆（DNA cloning）就是应用酶学的方法，在体外将各种来源的遗传物质——同源的或异源的、原核的或真核的、天然的或人工的 DNA 与载体 DNA 结合成一具有自我复制能力的 DNA 分子——复制子（replicon），继而通过转化或转染宿主细胞、筛选出含有目的基因的转化子细胞，再进行扩增、提取获得大量同一 DNA 分子，即 DNA 克隆。由于早期研究是从较大的染色体分离、扩增特异性基因，因此 DNA 克隆又称基因克隆（gene cloning）。“克隆”某一基因或 DNA 片段过程中，将外源 DNA 插入载体分子所形成的复制子是杂合分子——嵌合 DNA（DNA chimeras），所以 DNA 克隆或基因克隆又称重组 DNA（recombinant DNA）。

实现基因克隆所采用的方法及相关的工作统称重组 DNA 技术或重组 DNA 工艺学（recombinant DNA technology），又称基因工程（genetic engineering）。基因工程与当前发展的蛋白质工程、酶工程和细胞工程共同构成了当代新兴的学科领域——生物技术工程。生物技术工程的兴起为现代科学技术发展和工农业、医药卫生事业的进步提供了巨大潜力。

（二）工具酶

在重组 DNA 技术中，常需要一些工具酶进行基因操作。例如，对目的基因（target DNA）进行处理时，需利用序列特异的限制性核酸内切酶在准确的位置切割 DNA，使较大的 DNA 分子成为一定大小的 DNA 片段；构建重组 DNA 分子时，必须在 DNA 连接酶催化下才能使 DNA 片段与克隆载体共价连接。此外，还有一些工具酶也都是重组 DNA 时所必不可少的。现将某些常用工具酶概括于表 14-1。

在所有工具酶中，限制性内切核酸酶具有特别的重要意义。所谓限制性内切核酸酶

表 14-1 重组 DNA 技术中常用的工具酶

工具酶	功能
限制性核酸内切酶	识别特异序列，切割 DNA
DNA 连接酶	催化 DNA 中相邻的 5′-磷酸基和 3′-羟基末端之间形成磷酸二酯键，使 DNA 切口封合或使两个 DNA 分子或片段连接
DNA 聚合酶 I	①合成双链 cDNA 分子或片段连接 ②缺口平移制作高比活探针 ③DNA 序列分析 ④填补 3′-末端
Klenow 片段	又名 DNA 聚合酶 I 大片段，具有完整 DNA I 的 5′→3′聚合、3′→5′外切活性，而无 5′→3′外切活性。常用于 cDNA 第二链合成，双链 DNA 3′-末端标记等
反转录酶	①合成 cDNA ②替代 DNA 聚合酶 I 进行填补，标记或 DNA 序列分析
多聚核苷酸激酶	催化多聚核苷酸 5′-羟基末端磷酸化，或标记探针
末端转移酶	在 3′-羟基末端进行同质多聚物加尾
碱性磷酸酶	切除末端磷酸基

(restriction endonuclease) 就是识别 DNA 的特异序列，并在识别位点或其周围切割双链 DNA 的一类内切酶。限制性内切核酸酶存在于细菌体内，与相伴存在的甲基化酶 (methylase) 共同构成细菌的限制-修饰体系 (restriction modification system)，限制外源 DNA、保护自身 DNA，对细菌遗传性状的稳定遗传具有重要意义。目前发现的限制性内切核酸酶有 1800 种以上。根据酶的组成，所需因子及裂解 DNA 方式的不同，可将限制性内切核酸酶分为三类。重组 DNA 技术中常用的限制性内切核酸酶为 II 类酶，例如，*EcoR I*、*BamH I* 等就属于这类酶。大部分 II 类酶识别 DNA 位点的核苷酸序列呈二元旋转对称，通常称这种特殊的结构顺序为回文结构 (palindrome)。例如，下述序列即为 *EcoR I* 识别序列，其中箭头所指便是 *EcoR I* 的切割位点：

5′ G A A T T C 3′
3′ C T T A A▲G 5′

限制酶的命名是根据含有该酶的微生物种属而定。通常由三个斜体字母的略语来表示。第一个大写字母取自细菌属名的第一个字母，第二、三个小写字母取自微生物种名的头两个字母。遇有株名，再于其后加一大写。如果同一株名发现几种限制酶，则根据其被发现和分离的先后顺序，用罗马数字表示。例如，从淀粉液化芽孢杆菌 (bacillus amyloliguefaciens) H 株中发现分离出的第一种限制酶，被称为 *BamH I*。

所有限制性内切核酸酶切割 DNA 均产生含 5′-磷酸基和 3′-羟基基团的末端。其中有些酶，如 *EcoR I* 能使其识别序列相对两链之间的数个碱基对 (base pairs，bp) 分开，形成 5′-末端突出的黏性末端 (cohesive end 或 sticky end)。还有一些酶产生具有 3′-末端突出的黏性末端，如 *Pst I*：

5′ C T G C A G 3′
3′ G▲A C G T C 5′

而另一些酶切割 DNA 后产生平头或钝性末端 (blunt end)，如 *Hpa I*：

5′ G T T A A C 3′
3′ C A A▲T T G 5′

不同限制性内切核酸酶识别DNA中核苷酸序列长短不一，有的识别序列是四核苷酸序列，有的是六或八核苷酸序列。如果DNA序列是随机的，那么特异四核苷酸序列可能在每256bp出现一次，六核苷酸序列出现的间隔是4kb，八核苷酸序列出现的间隔是65kb。这种可能性随GC含量变化而变化。不同的酶切割DNA频率不同，切割DNA后产生黏性末端长短不一样，所产生末端的性质也不同，这对重组DNA或有关分子生物学操作及应用影响很大。

有些限制性内切核酸酶虽然识别序列不完全相同，但切割DNA后产生相同类型的黏性末端，称配伍末端（compatible end），可进行相互连接；产生平端的酶切割DNA后，也可彼此连接。

现列举某些限制性内切核酸酶如表14-2。

表14-2　限制性内切核酸酶

名　称	识别序列及切割位点	名　称	识别序列及切割点
切割后产生5′突出末端：		*Hae* Ⅱ	5′...PuGCGC▼Py...3′
BamH Ⅰ	5′...G▼GATCC...3′	*Kpn* Ⅰ	5′...GGTAC▼C...3′
Bgl Ⅱ	5′...A▼GATCT...3′	*Pst* Ⅰ	5′...CTGCA▼G...3′
EcoR Ⅰ	5′...G▼AATTC...3′	*Sph* Ⅰ	5′...GCATG▼C...3′
Hind Ⅲ	5′...A▼AGCTT...3′	切割后产生平末端：	
Hpa Ⅱ	5′...C▼CGG...3′	*Alu* Ⅰ	5′...AG▼CT...3′
Mbo Ⅰ	5′...▼GATC...3′	*EcoR* Ⅴ	5′...GAT▼ATC...3′
Nde Ⅰ	5′...GA▼TATG...3′	*Hae* Ⅲ	5′...GG▼CC...3′
切割后产生3′突出末端：		*Pvu* Ⅱ	5′...CAG▼CTG...3′
Apa Ⅰ	5′...GGGCC▼C...3′	*Sma* Ⅰ	5′...CCC▼GGG...3′

（三）目的基因

应用重组DNA技术的目的有时是为分离、获得某一感兴趣的基因或DNA序列，或是为获得感兴趣基因的表达产物——蛋白质。这些感兴趣的基因或DNA序列就是目的基因，又称目的DNA（target DNA）。目的DNA有两种类型，即cDNA和基因组DNA。cDNA（complementary DNA）是指经反转录合成的、与RNA（通常指mRNA或病毒RNA）互补的单链DNA。以单链cDNA为模板、经聚合反应可合成双链cDNA。基因组DNA（genomic DNA）是指代表一个细胞或生物体整套遗传信息（染色体及线粒体）的所有DNA序列。进行DNA克隆时，所构建的嵌合DNA分子是由载体DNA与某一来源的cDNA或基因组DNA连接而成。cDNA或基因组DNA即含有我们感兴趣的基因或DNA序列——目的基因，又称外源DNA。

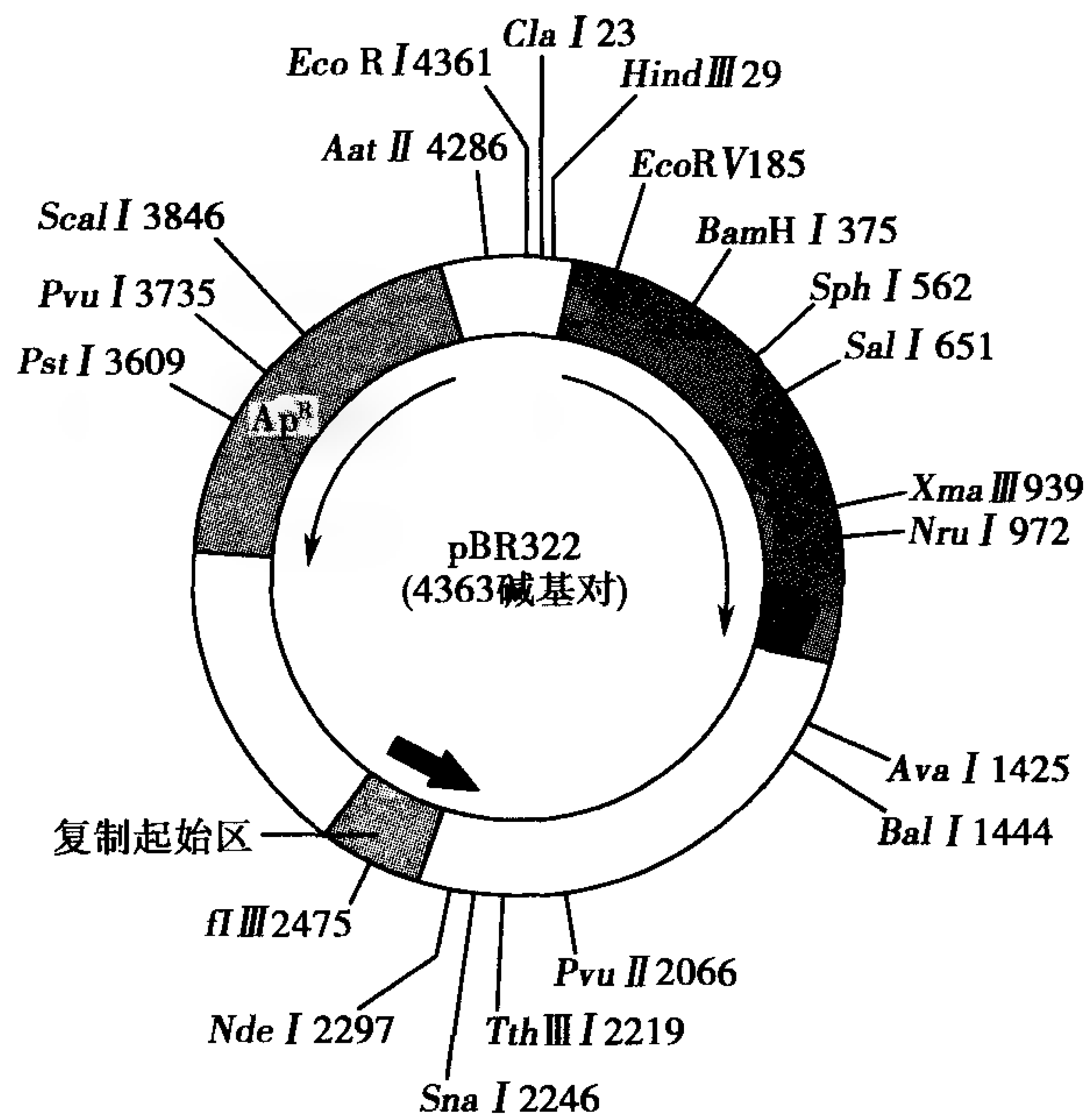
（四）基因载体

基因载体或称克隆载体（cloning vector），这是为“携带”感兴趣的外源DNA、实现外源DNA的无性繁殖或表达有意义的蛋白质所采用的一些DNA分子。其中，为使插入的外源DNA序列可转录、进而翻译成多肽链而特意设计的克隆载体又称表达载体（expression vector）。可充当克隆载体的DNA分子有质粒DNA、噬菌体DNA和病毒DNA，它们经适当改造后仍具有自我复制能力，或兼有表达外源基因的能力。

所谓质粒（plasmid）是存在于细菌染色体外的小型环状双链DNA分子，小的2～

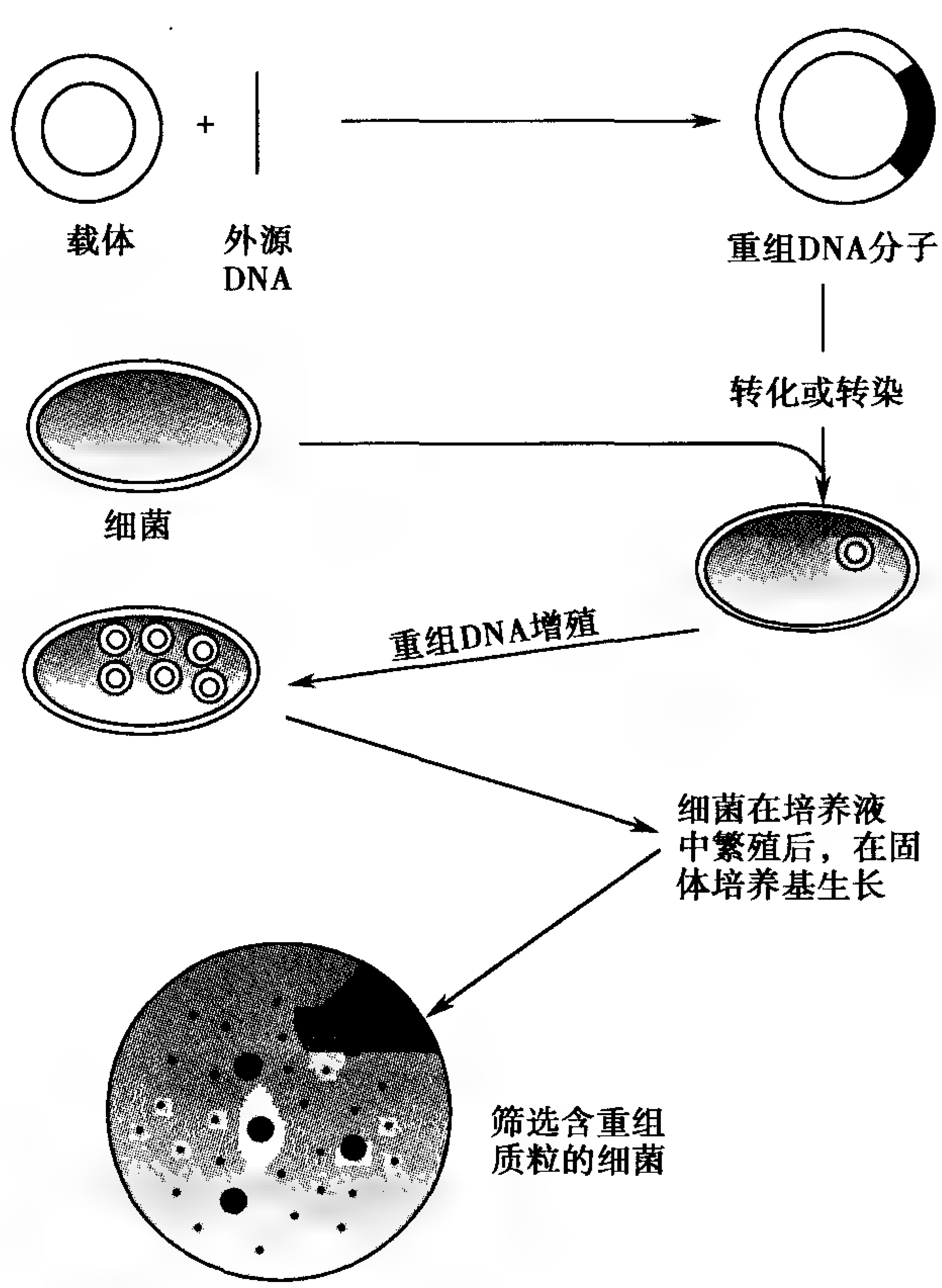
3kb，大的可达数百 kb。质粒分子本身是含有复制功能的遗传结构，能在宿主细胞独立自主地进行复制，并在细胞分裂时保持恒定地传给子代细胞。质粒带有某些遗传信息，所以会赋予宿主细胞一些遗传性状，如对青霉素或重金属的抗性等。根据质粒赋予细菌的表型可识别质粒的存在，是筛选转化子细菌的根据。因此，质粒 DNA 的自我复制功能及所携带的遗传信息在重组 DNA 操作，如扩增、筛选过程中都是极为有用的。

pBR322 质粒(图 14-9)是稍早构建的质粒载体,其 DNA 分子中含有单个 *EcoR Ⅰ*限制性内切核酸酶位点,可在此插入外源基因。此外还含有 ter^r 和 amp^r 抗药基因,分别为抗四环素、抗氨苄青霉素的酶编码,使细菌产生抗性。这个质粒还含有一个复制起始点(ori)及与 DNA 复制调节有关的序列,赋予 pBR322 质粒复制子特性。



●图 14-9　质粒 DNA pBR322

常用作克隆载体的噬菌体 DNA 有 λ 噬菌体和 M13 噬菌体。稍早经 λ 噬菌体 DNA 改造成的载体系统有 λgt 系列（插入型载体，适用于 cDNA 克隆）和 EMBL 系列（置换型载体，适用于基因组 DNA 克隆）。经改造的 M13 载体有 M13mp 系列及 pUC 系列。它们是在 M13 基因间隔区插入 *E. coli* 的一段调节基因及 *lacZ* 的 N 端 146 个氨基酸残基编码基因，其编码产物即为 β 半乳糖苷酶的 α 片段。突变型 *lac*-*E. coli* 可表达该酶的 ω 片段（酶的 C 端）。单独存在的 α 及 ω 片段均无 β 半乳糖苷酶活性，只有宿主细胞与克隆载体同时共表达两个片段时，宿主细胞内才有 β 半乳糖苷酶活性，使特异性作用物变为蓝色化合物，这就是所谓的 α 互补（alpha complementation）。由 M13 改造的载体含不同位置的克隆位点，可接受不同限制性内切酶的酶切片段。如果插入的外源基因是在 *lacZ* 基因内，则会干扰 *lacZ* 的表达，利用 *lac*-*E. coli* 为转染或感染细胞，在含 *X-gal* 的培养基上生长时会出现白色菌落；如果在 *lacZ* 基因内无外源基因插入，则有 *lacZ* 表达，转化菌在同样条件下呈蓝色菌落（图 14-10）。再结合插入片段的序列测定可筛选、鉴定重组体与非重组体载体。



●图 14-10　以质粒为载体的 DNA 克隆过程

为增加克隆载体插入外源基因的容量，还设计有柯斯质粒载体（cosmid vector）和酵母人工染色体载体（yeast artificial chromosome vector，YAC）。为适应真核细胞重组DNA技术需要，特别是为满足真核基因表达或基因治疗的需要，发展了一些用动物病毒DNA改造的载体，如腺病毒载体、逆转录病毒载体以及用于昆虫细胞表达的杆状病毒载体等。

二、重组 DNA 技术基本原理及操作步骤

一个完整的DNA克隆过程应包括：目的基因的获取，基因载体的选择与构建，目的基因与载体的拼接，重组DNA分子导入宿主细胞，筛选并无性繁殖含重组分子的受体细胞（转化子）。图14-10是以质粒为载体进行DNA克隆的模式图。

（一）目的基因的获取

目前获取目的基因大致有如下几种途径或来源。

1. 化学合成法如果已知某种基因的核苷酸序列，或根据某种基因产物的氨基酸序列推导出为该多肽链编码的核苷酸序列，可以利用DNA合成仪通过化学合成法合成目的基因。一般用于小分子活性多肽基因的合成。利用该法合成的基因已有：人生长激素释放抑制因子、胰岛素原、脑啡肽及干扰素基因等。

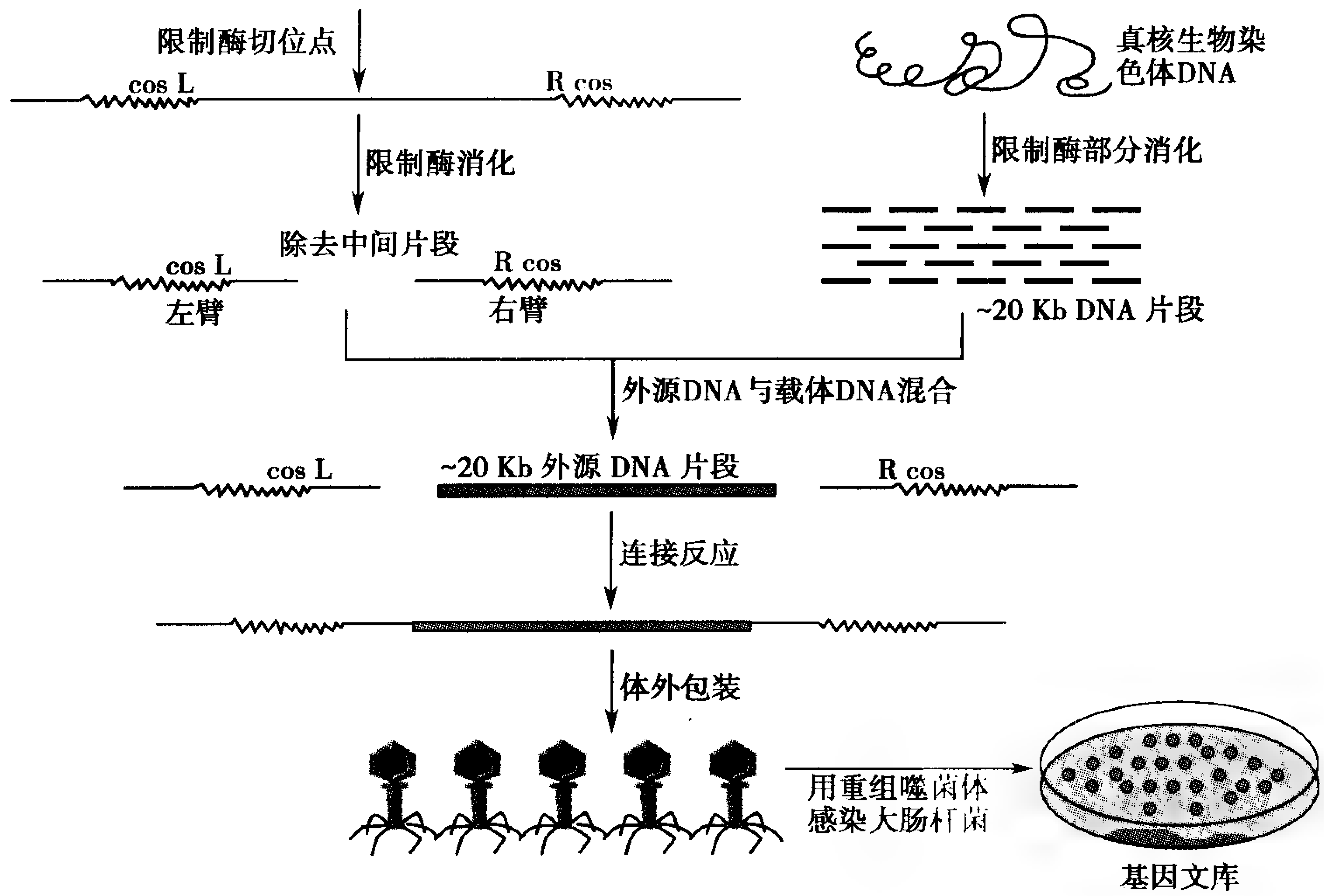
2. 基因组DNA文库分离组织或细胞染色体DNA，利用限制性内切核酸酶（如Sau 3A Ⅰ或Mbo Ⅰ）将染色体DNA切割成基因水平的许多片段，其中即含有我们感兴趣的基因片段。将它们与适当的克隆载体拼接成重组DNA分子，继而转入受体菌扩增，使每个细菌内都携带一种重组DNA分子的多个拷贝。不同细菌所包含的重组DNA分子内可能存在不同的染色体DNA片段，这样生长的全部细菌所携带的各种染色体片段就代表了整个基因组。存在于转化细菌内、由克隆载体所携带的所有基因组DNA的集合称基因组DNA文库（genomic DNA library）。基因组DNA文库就像图书馆库存万卷书一样，涵盖了基因组全部基因信息，也包括我们感兴趣的基因。与一般图书馆不同的是，基因组DNA文库没有图书目录，建立基因文库后需结合适当筛选方法从众多转化子菌落中选出含有某一基因的菌落，再行扩增，将重组DNA分离、回收，获得目的基因的无性繁殖系——克隆。图14-11即为构建基因组DNA文库的全过程。

3. cDNA文库以mRNA为模板，利用反转录酶合成与mRNA互补的DNA（complementary DNA，cDNA），再复制成双链cDNA片段，与适当载体连接后转入受体菌，即获得cDNA文库（cDNA library）。与上述基因组DNA文库类似，由总mRNA制作的cDNA文库包含了细胞表达的各种mRNA信息，自然也含有我们感兴趣的编码cDNA。然后，采用适当方法从cDNA文库中筛选出目的cDNA。当前发现的大多数蛋白质的编码基因几乎都是这样分离的。cDNA文库构建见图14-12。

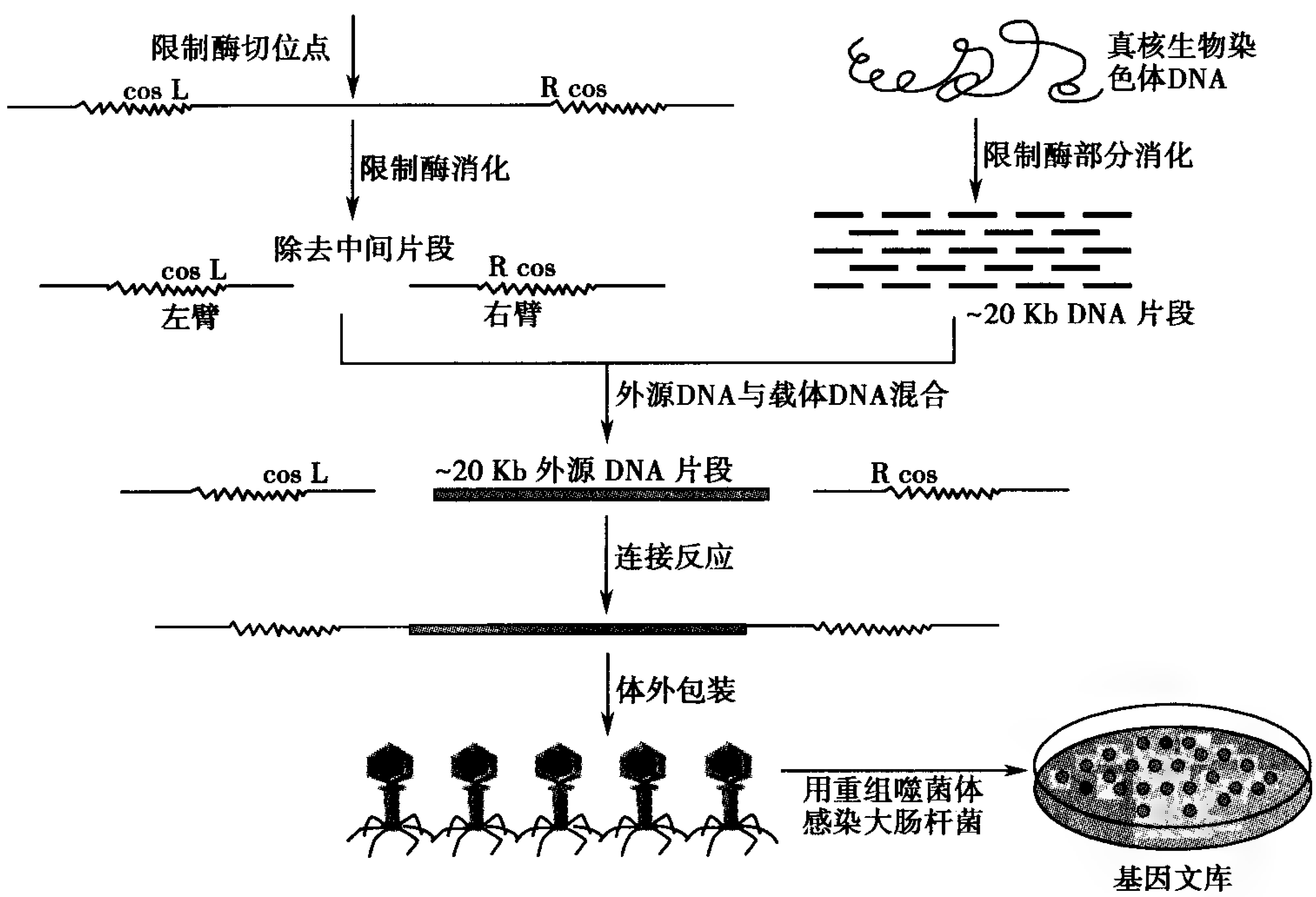
4. 聚合酶链反应目前，已广泛采用聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）获取目的DNA。PCR是一种在体外利用酶促反应获得特异序列的基因组DNA或cDNA的专门技术（见第二十一章）。要获得目的基因，除PCR技术的通用条件外，还必须知道目的基因5′、3′端的各一段核苷酸序列及其他相关条件，以设计出合适的引物。

（二）克隆载体的选择和构建

外源DNA片段离开染色体是不能复制的。如果将外源DNA连到复制子上，外源DNA则可作为复制子的一部分在受体细胞中复制。这种复制子就是克隆载体（见本章第一节）。重组DNA技术中克隆载体的选择和改进是一种极富技术性的专门工作，目的不同，操作基因的性质不同，载体的选择和改建方法也不同。



●图 14-11　用随机切割的真核生物染色体 DNA 片段构建基因文库



●图 14-12　构建 cDNA 文库示意图

（三）外源基因与载体的连接

通过不同途径获取含目的基因的外源 DNA、选择或改建适当的克隆载体后，下一步工作是将外源 DNA 与载体 DNA 连接在一起，即 DNA 的体外重组。与自然界发生的基因重组（见本章第一节）不同，这种人工 DNA 重组是靠 DNA 连接酶将外源 DNA 与载体共价连接的。改建载体、着手进行外源基因与载体连接前，必须结合研究目的及感兴趣基因

的特性，认真设计最终构建的重组体分子。这是一件富含技巧且技术性极强的工作，这里仅就连接方式作扼要介绍。

1. 黏性末端连接

(1) 同一限制酶切位点连接：由同一限制性内切核酸酶切割的不同 DNA 片段具有完全相同的末端。只要酶切割 DNA 后产生单链突出（5′突出及 3′突出）的黏性末端，如：

5′	G G T G A A T T C A G C	3′
3′	C C A C T T A A▲G T C G	5′
5′	T T G C T G C A G A A G	3′
3′	A A C G▲A C G T C T T C	5′

同时酶切位点附近的 DNA 序列不影响连接，那么，当这样的两个 DNA 片段一起退火（anneal）时，黏性末端单链间进行碱基配对，然后在 DNA 连接酶催化作用下形成共价结合的重组 DNA 分子。

(2) 不同限制性内切酶位点连接：由两种不同的限制性内切核酸酶切割的 DNA 片段，具有相同类型的黏性末端，即配伍末端，也可以进行黏性末端连接。例如 *Mbo I*（▼ GATC）和 *BamH I*（G▲GATCC）切割 DNA 后均可产生 5′突出的 GATC 黏性末端，彼此可相互连接。

2. 平端连接 DNA 连接酶可催化相同和不同限制性内切核酸酶切割的平端之间的连接。原则上讲，限制酶切割 DNA 后产生的平端也属配伍末端，可彼此相互连接；若产生的黏性末端经特殊酶处理，使单链突出处被补齐或削平，变为平端，也可施行平端连接。

3. 同聚物加尾连接同聚物加尾连接是利用同聚物序列，如多聚 A 与多聚 T 之间的退火作用完成连接。在末端转移酶（terminal transferase）作用下，在 DNA 片段末端加上同聚物序列、制造出黏性末端，而后进行黏性末端连接。这是一种人工提高连接效率的方法，属于黏性末端连接的一种特殊形式。

4. 人工接头连接对平端 DNA 片段或载体 DNA，可在连接前将磷酸化的接头（linker）或适当分子连到平末端，使产生新的限制性内切核酸酶位点，再用识别新位点的限制性内切核酸酶切除接头的远端，产生黏性末端。这也是黏性末端连接的一种特殊形式。

(四) 重组 DNA 导入宿主细胞

外源 DNA（含目的 DNA）与载体在体外连接成重组 DNA 分子（嵌合 DNA）后，需将其导入宿主细胞。随受体细胞生长、增殖，重组 DNA 分子得以复制、扩增，这一过程即为无性繁殖；筛选出的含目的 DNA 的重组体分子即为一无性繁殖系或克隆。进行无性繁殖时所采用的宿主细胞可为原核细胞也可为真核细胞，原核细胞常用从大肠杆菌 K12 改造的安全宿主菌，在人的肠道几无存活率或存活率极低。按安全标准，所采用的宿主细胞应为限制酶和重组酶缺陷型。在选择适当的受体菌（原核）后，经适当的理化方法处理后，使宿主细胞处于最适摄取和容忍重组体的状态，即成感受态细胞（competent cell）。根据重组 DNA 时所采用的载体性质不同，导入重组 DNA 分子有转化（transformation）、转染（transfection）和感染（infection）等不同方式。

(五) 重组体的筛选

通过转化、转染或感染，重组体 DNA 分子被导入受体细胞，经适当涂布的培养基培养得到大量转化子菌落或转染噬菌斑。因为每一重组体只携带某一段外源基因，而转化或转染时每一受体菌又只能接受一个重组体分子，所以设法将众多的转化菌落或菌斑区分开来，并鉴定哪一菌落或噬菌斑所含重组 DNA 分子确实带有目的基因，即可得到目的基因的克隆，这一过程即为筛选（screening）或选择（selection）。根据载体体系、宿主细胞特

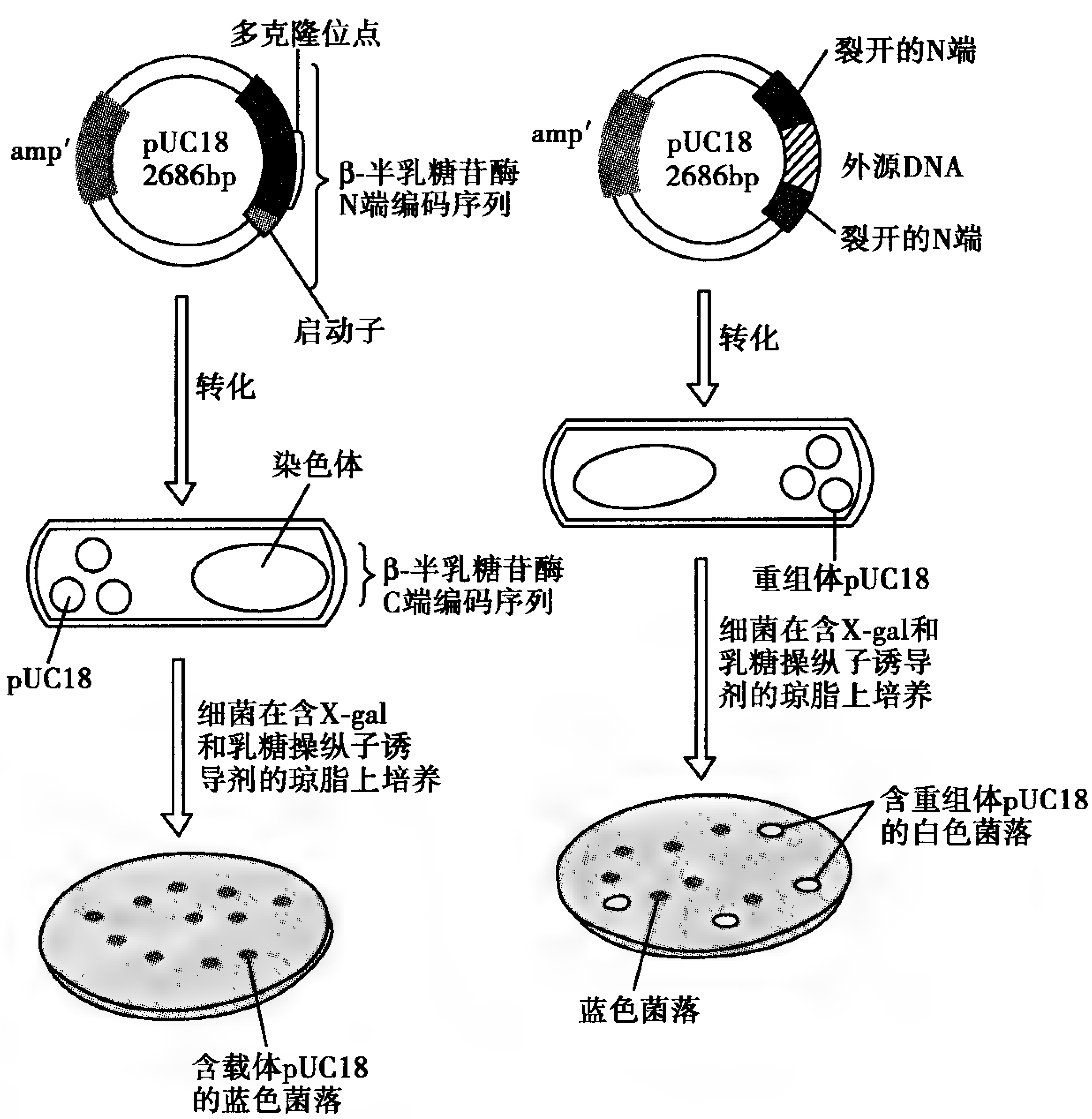
性及外源基因在受体细胞表达情况不同，可采取直接选择法和非直接选择法。

1. 直接选择法针对载体携带某种或某些标志基因和目的基因而设计的筛选方法，称为直接选择法（direct selection），其特点是直接测定基因或基因表型。

（1）抗药性标志选择：如果克隆载体携带有某种抗药性标志基因，如 amp^r、tet^r 或加 kan^r，转化后只有含这种抗药基因的转化子细菌才能在含该抗生素的培养板上生存并形成菌落，这样就可将转化菌与非转化菌区别开来。如果重组 DNA 时将外源基因插入标志基因内，标志基因失活，通过有、无抗生素培养基对比培养，还可区分单纯载体或重组载体（含外源基因）的转化菌落。噬菌体载体转化菌形成的噬菌斑也是一种筛选特征。此法只适用于阳性重组体的初步筛选。

（2）标志补救：若克隆的基因能够在宿主菌表达，且表达产物与宿主菌的营养缺陷互补，那么就可以利用营养突变菌株进行筛选，这就是标志补救（marker rescue）。酵母咪唑甘油磷酸脱水酶基因表达产物与细菌组氨酸合成有关。当酵母 DNA 与λ噬菌体载体结合后，再将重组子转染或感染组氨酸缺陷型大肠杆菌，在无组氨酸的培养基中培养。因为只有带咪唑甘油磷酸脱水酶重组基因的菌株才能在无组氨酸的培养基中生长，所以这样获得的生长菌即含有咪唑甘油磷酸脱水酶基因。

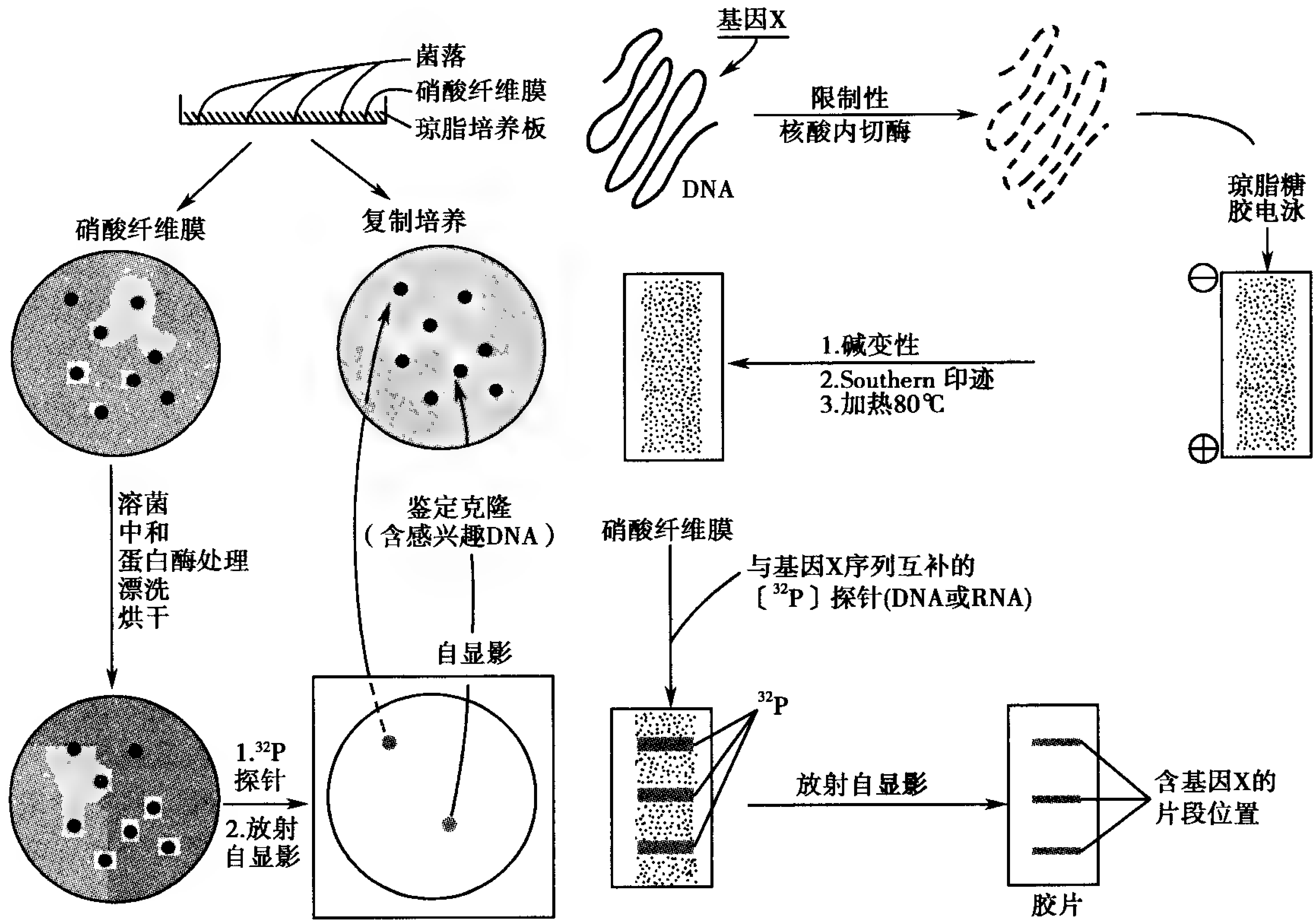
利用α互补筛选携带重组质粒的细菌也是一种标志补救选择方法。关于α互补原理在本章第一节已有介绍，这里以质粒 pUC18 作载体为例，以图 14 13 概括说明将外源基因插入载体 *lacZ* 基因 N 端序列时是如何进行筛选的。



●图 14-13　利用α互补原理筛选重组体 pUC18

（3）分子杂交法：这是利用 ^{32}P 标记的探针与转移至硝酸纤维素膜上的转化子 DNA 或克隆的 DNA 片段进行分子杂交，直接选择并鉴定目的基因。图 14-14 所示方

法称原位杂交（in situ hybridization），图 14-15 所示方法为 Southern 印迹（Southern blotting）技术。在分子生物学技术中，还有一种原位杂交技术是用于检测某一基因在组织内的定位表达，这与分子克隆筛选的原位杂交是两个不同的概念或技术，应注意区分。



●图 14-14　原位杂交　　　●图 14-15　Southern 印迹

2. 免疫学方法　如果克隆基因的蛋白质产物是已知的，可利用特异抗体与目的基因表达产物相互作用进行筛选，因此属非直接选择法。免疫学方法特异性强、灵敏度高，尤其适用于选择不为宿主菌提供任何选择标志的基因。免疫学方法又可根据具体基因选择操作过程不同，分为免疫化学方法及酶免检测分析（enzyme immunodetection assay）等。免疫化学方法的基本工作原理是：将琼脂培养板上的转化子菌落经氯仿蒸气裂解、释放抗原，再将固定有抗血清（目的基因编码蛋白质特异的免疫血清）的聚乙烯薄膜覆盖在裂解菌落上，在薄膜上得到抗原抗体复合物。再使^{125}I-IgG 与薄膜反应，^{125}I-IgG 即可结合于抗原不同位点。最后经放射自显影检出阳性反应菌落。

以上所述的目的基因的分离、载体选择、重组 DNA 构建与导入、筛选重组体等即为基因克隆，是基本的重组 DNA 技术操作过程，也可形象地归纳为“分、切、接、转、筛”，即分离目的基因，限制酶切目的基因与载体，拼接重组体、转入宿主细胞、筛选重组体。而作为基因工程的最终目的，是要利用重组 DNA 技术获得目的基因的表达产物，故还需进一步的进行克隆基因的表达。

（六）克隆基因的表达

经上述过程分离、获得特异序列的基因组 DNA 或 cDNA 克隆，即基因克隆，这是进行重组 DNA 技术操作的基本目的之一。此外，采用重组 DNA 技术还可进行目的基因的

表达，实现生命科学研究、医药或商业目的，亦即基因工程的最终目标。它涉及正确的基因转录、mRNA 翻译及适当的转录后、翻译后加工过程。这些过程的进行在不同的表达体系是不一样的，克隆的目的基因正确而大量表达有特殊意义的蛋白质已成为重组 DNA 技术中一个专门的领域，这就是蛋白质表达（protein expression）。在蛋白质表达领域，表达体系的建立包括表达载体的构建、受体细胞的建立及表达产物的分离、纯化等技术和策略。基因工程的表达系统包括原核和真核表达体系。

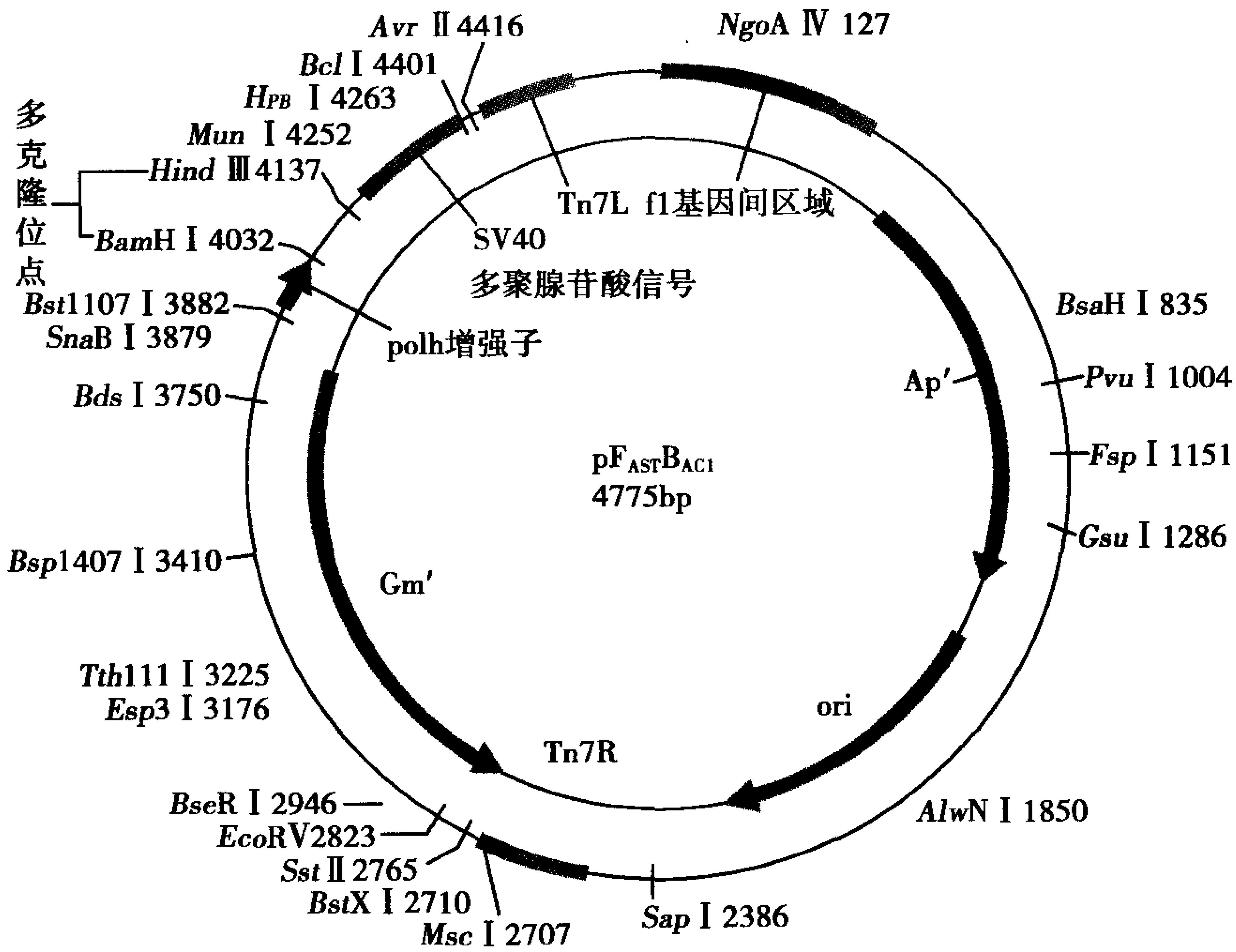
1. 原核表达体系 *E. coli* 是当前采用最多的原核表达体系，其优点是培养方法简单、迅速、经济而又适合大规模生产工艺，再加上人们运用 *E. coli* 表达外源基因已经有 20 多年的经验。运用 *E. coli* 表达有用的蛋白质必须使构建的表达载体符合下述标准：①含大肠杆菌适宜的选择标志；②具有能调控转录、产生大量 mRNA 的强启动子，如 *lac*、*tac* 启动子或其他启动子序列；③含适当的翻译控制序列，如核糖体结合位点（ribosome binding site）和翻译起始点等；④含有合理设计的多接头克隆位点（polylinker cloning sites），以确保目的基因按一定方向与载体正确衔接。将目的基因插入适当表达载体后，经过转化、筛选获得正确的转化子细菌即可直接用于蛋白质的表达，这是一般方法。在实际工作中，个别具体过程差异很大，表达策略颇不一致。有时表达目的是为获得蛋白质抗原，以便制备抗体，此时要求表达的蛋白质或多肽片段具有抗原性，同时要求表达产物易于分离、纯化。较好的策略是在目的基因前连上一个为特殊多肽编码的附加序列，表达融合蛋白。在这种情况下表达的蛋白质多为不溶性的包涵体（inclusion body），极易与菌体蛋白分离。如果在设计融合基因时，在目的基因与附加序列之间加入适当的裂解位点，则很容易从表达的杂合分子去除附加序列。巧妙的附加序列设计还可大大方便表达产物的分离、纯化。如果表达的蛋白质是为用于生物化学、细胞生物学研究或临床应用，除分离、纯化方便，更重要的是考虑蛋白质的功能或生物学活性。此时，表达可溶性蛋白质往往具有特异的生物学功能；如果表达的是包涵体形式，还需在分离后进行复性或折叠。

E. coli 表达体系在实际应用中尚有一些不足之处：①由于缺乏转录后加工机制，*E. coli*表达体系只能表达克隆的 cDNA，不宜表达真核基因组 DNA；②由于缺乏适当的翻译后加工机制，*E. coli* 表达体系表达的真核蛋白质不能形成适当的折叠或进行糖基化修饰；③表达的蛋白质常常形成不溶性的包涵体，欲使其具有活性尚需进行复杂的复性处理；④很难在 *E. coli* 表达体系表达大量的可溶性蛋白。

2. 真核表达体系与原核表达体系比较，真核表达体系除与原核表达体系有相似之处外，一般还常有自己的特点。真核表达载体通常含有选择标记、启动子、转录翻译终止信号、mRNA 加 poly A 信号或染色体整合位点等。真核表达体系大多是穿梭载体，有两套复制原点及选择标记，分别在大肠杆菌和真核细胞中作用。

真核表达系统包括有酵母、昆虫及哺乳类动物细胞三类表达体系，如哺乳类动物细胞，不仅可表达克隆的 cDNA，而且还可表达真核基因组 DNA。哺乳类细胞表达的蛋白质通常总是被适当修饰，而且表达的蛋白质会恰当地分布在细胞内一定区域并积累。当然，操作技术难、费时、费钱是其缺点。如何将克隆的重组 DNA 分子导入真核细胞是关键步骤。将表达载体导入真核细胞的过程称转染（transfection），它比转染 *E. coli* 的方法要难得多。常用于细胞转染的方法有：磷酸钙转染（calcium phosphate transfection）、DEAE 葡聚糖介导转染（DEAE dextranmediated transfection）、电穿孔（electroporation）、脂质体转染（liposome transfection）及显微注射（microinjection）等。转染方法的选择须根据细胞的种类、特性及表达载体性质而定。例如，采用爪蟾卵母细胞（oocyte）作表达体系时，卵母细胞极大，适合采用显微注射法导入外源基因。一般说，

大多数细胞均可采用磷酸钙转染和 DEAE 葡聚糖介导转染方法进行瞬时转染（transient transfection），操作条件简单，不需特殊设备；而且通过这两种方法与电穿孔技术一样均会使小部分外源基因整合进细胞染色体，实现稳定转染（stable transfection）。稳定转染转化子细胞的筛选依赖特异的抗性标志。如果在重组的哺乳类细胞表达载体中含有可供筛选的遗传标志是细菌的 *neo* 基因，*neo* 基因编码的新霉素磷酸转移酶可使细胞培养液中的 G418（Geneticin）磷酸化而失活，稳定转染的细胞就会在含 G418 的培养液中存活并增殖。另一用于筛选稳定转染的哺乳类细胞的体系是二氢叶酸还原酶（DHFR）及 DHFR 缺陷细胞，如果表达载体含有 *dhfr* 基因，稳定转染的 DHFR 缺陷细胞就会在有甲氨蝶呤（MTX）的培养液中生存；非转染的缺陷细胞不能存活而被淘汰。当前采用最多的哺乳类细胞是 COS 细胞（猿猴肾细胞）和 CHO 细胞（中国仓鼠卵巢细胞）（图 14-16）。



●图 14-16　真核表达载体

第三节　重组 DNA 技术与医学的关系非常密切并前景远大

1990 年诞生的分子医学（molecular medicine）是重组 DNA 技术与医学实践相结合的结果。它是由基因克隆技术、基因转移技术、PCR 技术等应用于临床，产生了基因诊断、基因治疗和基因预防的新方法等的基础上产生的。所包含的领域及内容概括如下。

一、疾病基因的发现与克隆

重组 DNA 技术的应用使分子遗传学家有可能根据基因定位，而不是它的功能来克隆一个基因。根据克隆基因的定位和性质研究所提供的线索，可进一步确定克隆的基因在分子遗传病中的作用。因此，一个疾病相关基因的发现不仅可导致新的遗传病的发现，而且

对遗传病的诊断和治疗都是极有价值的。随着人类基因组计划（human genome project，HGP）的完成，疾病基因的发现将越来越多。

疾病基因发现的两个典型例子是脆性X综合征及Kallmann综合征。若干年来，已发现细胞内有含脆性位点（fragile site）的DNA存在，并鉴定了脆性X位点范围的DNA特殊标志。这部分DNA与常见的精神痴呆——脆性X综合征（fragile X syndrome）发病有关，但对其确切分子机制并无深入认识。应用酵母人工染色体（YAC）克隆及分子杂交技术现已证明，所谓脆性位点就是$(CGG)_n$重复序列。这种重复序列具有多态性（polymorphism），即在正常群体可有6～54个重复单位，但在受累个体却高达数百（>200个重复单位）。重复序列的扩增使$(CGG)_n$所属相应基因（FMR1）不能转录相应的RNA，从而使受累个体表现脆性X综合征。Kallwann综合征系因促性腺激素分泌不足而引起性腺发育不良、性腺功能低下，嗅觉功能减退或丧失。染色体步移（chromosome walking）方法证明Kallwann综合征患者KALIG-1基因有缺失突变。KALIG-1基因产物参与神经细胞的粘连和神经轴突的导向。KALIG-1蛋白与神经迁移和演变的关系说明该基因缺失突变是Kallwann综合征的发病基础。

二、生物制药

利用基因工程生产有药用价值的蛋白质、多肽产品已成为当今世界一项重大产业，并将有望成为21世纪的支柱产业。2000年我国基因工程药物和疫苗年销售额已达近20亿元。重组蛋白质药物生产是在功能研究、基因克隆基础上，构建适当的表达体系表达有生物活性的蛋白质、多肽；再经过科学的动物实验、严格的临床试验和药物审查，发展为新药物。目前已经或正投入市场的主要产品已有近20种，详见表14-3：

表14-3　重组DNA医药产品

产品	功能
组织胞质素原激活剂	抗凝
血液因子Ⅷ	促进凝血
颗粒细胞-巨噬细胞集落	刺激白细胞生成刺激因子
促红细胞生成素	刺激白细胞生成
生长因子（bFGF，EGF）	刺激细胞生长与分化
生长素	治疗侏儒症
胰岛素	治疗糖尿病
干扰素（α1b，α2a，α2b，γ）	抗病毒感染及某些肿瘤
白细胞介素	激活、刺激各类白细胞
超氧化物歧化酶	抗组织损伤
单克隆抗体	利用其结合特异性进行诊断试验、肿瘤导向治疗
乙肝疫苗（CHO，酵母）	预防乙肝
口服重组B亚单位菌体	预防霍乱
霍乱菌苗	

胰岛素的人工合成到基因工程药物

自 20 世纪 70 年代初基因工程问世以来，基因工程药物的研究与开发一直是发展最快和最活跃的领域。1921 年，在加拿大工作的 F. G. Banting 医生、Toronto 大学的生理学教授 J. Macleod 以及他的学生等人，共同组成研究小组，从狗的胰腺中提取了胰岛素，并且进行提纯，1922 年 1 月 23 日首次给一个 14 岁的男孩注射了这种胰腺提取物，让人惊喜的是，男孩的血糖下降到了正常水平，尿糖及尿酮体消失了。这一简单的治疗实验开创了使用胰岛素治疗糖尿病的先河。F. G. Banting 和 J. Macleod 教授在 1923 年被授予诺贝尔生理医学奖。

1965 年 9 月 17 日，中国首次完整人工合成了结晶牛胰岛素。这是当时人工合成的具有生物活性的最大的天然有机高分子化合物，实验的成功使中国成为第一个合成蛋白质的国家。科学工作者将人工合成的产物注入小白鼠体内，测验它的生物活力。小白鼠因体内胰岛素增多而发生了惊厥反应，证明这种人工合成的产物就是具有生物活性的人工合成胰岛素。美国 Eli Lilly 公司于 1982 年首先利用重组 DNA 技术合成人胰岛素并投放市场，标志着生物工程药物时代的开始。迄今为止，已有 50 多种基因工程药物上市，近千种处于研发状态，形成了一个巨大的高新技术产业，产生了不可估量的社会效益和经济效益。

三、基因诊断与治疗

（一）基因诊断的概念

基因诊断又称 DNA 诊断，目前已发展成为一门独具特色的诊断学科。DNA 诊断是利用分子生物学及分子遗传学的技术和原理，在 DNA 水平分析、鉴定遗传性疾病所涉及基因的置换、缺失或插入等突变。目前用于 DNA 诊断的方法很多，但其基本过程相似——首先分离、扩增待测的 DNA 片段，然后利用适当分析手段，区分或鉴定 DNA 的异常。按现代遗传病诊断标准，一种可靠的 DNA 诊断学方法必须符合：①能正确扩增靶基因；②能准确区分单个碱基的差别；③本底或噪声低，不干扰 DNA 的鉴定；④便于完全自动化操作，适合大面积、大人群普查。随着人类基因组计划的完成和重要病原体、微生物等基因组测序工作的相继完成，为我们提供了更多可供检测的基因，将促进基因诊断向临床应用的快速发展。

（二）基因治疗的概念

所谓基因治疗（gene therapy）就是向有功能缺陷的细胞导入具有相应功能的外源基因，以纠正或补偿其基因缺陷，从而达到治疗的目的。基因治疗包括体细胞基因治疗和性细胞基因治疗。针对体细胞进行基因改良的基因治疗称体细胞基因治疗（somatic cell gene therapy），这类基因治疗仅单独治疗受累组织，类似于器官移植。性细胞基因治疗（germ line gene therapy）因对后代遗传性状有影响，目前仅限于动物实验（转基因动物），用于测试各种重组 DNA 在矫正遗传病方面是否有效。

四、遗传病的预防

疾病基因克隆不仅为医学家提供了重要工具，使他们能深入地认识、理解一种遗传病的发生机制，为寻求可能的治疗途径、预测疗效提供了有力手段；更重要的是，利用这些

成果进行极有意义的产前诊断和症候前诊断，而后通过诊断技巧与治疗、预防能力的结合，从根本上杜绝遗传性疾病的发生和流行。

1. 产前诊断　产前诊断可以通过胎儿组织活检、羊膜腔穿刺、羊膜绒毛样品及母体血液循环中的胎儿细胞进行。从安全角度考虑，无疑后者是最值得提倡的。从方法学考虑，尽管可进行染色体组型分析，发现染色体异常，但利用 PCR 技术结合 DNA 诊断学方法分析特异基因缺陷更宜推广。由于有少量胎儿细胞通过血行到母体血液循环中，使有可能利用细胞表面标志和荧光活化细胞分离器（fluorescence activated cell sorter，FACS）分离母体血中的胎儿细胞。随后利用这些少量细胞进行 PCR 扩增，这样就不必破坏或干扰妊娠而进行产前诊断。这是近年产前诊断一大发展。

2. 携带者测试基因　测试常用于检出隐性遗传病携带者，包括隐性遗传病受累个体家庭的其他成员和有特殊遗传病死亡家庭中的危险人群。例如囊性纤维变性是白种人儿童中最常流行的常染色体隐性遗传病，发病率为 1/2500；携带者普查阳性的夫妇生育受累儿童的危险性为 1/4；双亲阴性者为 1/109200；若配偶一方为阳性、另一方为阴性，其危险性为 1/661。由此可见，如果能建立可行的携带者测试方法，并能检出其绝大多数携带者，这对指导婚姻和生育是很有价值的。

3. 症状前诊断　对于某些单基因紊乱所引起的综合征，仅至晚年才会有明显表现，如成年多囊性肾病和 Huntington 病。由于对某些成年发病有关基因已有所掌握，故可在综合征发生前作出预测，协助他们作生活方式的调节、工作调整及生育的选择等。

4. 遗传病易感性　很多遗传病并非限于单基因缺陷，而是由多基因受累或者是由遗传和环境因素综合引起。在这种情况下，一个或多基因缺陷的存在会使个体对发病诱因极度敏感而易于发病。比如，有 LDL 受体基因缺陷的个体同时有高胆固醇血症，其冠状动脉患病率要比单纯高胆固醇血症者为高，这是不难理解的。一个发病个体的结局也依赖于其他基因缺陷和环境因素、生活习惯的影响。因此，根据 DNA 诊断，作好疾病的早期预防并注意环境卫生和个人生活方式，可以达到预防的目的。

小　　结

重组 DNA 技术是在人们对自然界基因转移和重组的认识基础上创立的新技术。自然界基因转移伴发重组有几种形式：即位点特异的重组、同源重组及转座重组。依赖整合酶、在两个 DNA 序列的特异位点间发生的整合称位点特异的重组。发生在同源序列间的重组称为同源重组，又称基本重组。而转座重组即某些基因从一个位置移动到另一位置。细菌的基因转移包括接合作用、转化作用、转导作用等。当细胞与细胞、或细菌通过菌毛相互接触时，质粒 DNA 从一个细胞转移至另一细胞，这种类型的 DNA 转移称为接合作用。通过自动获取或人为地供给外源 DNA，使细胞或培养的受体细胞获得新的遗传表型，这就是转化作用。由病毒携带、将宿主 DNA 片段从一个细胞转移至另一细胞的现象或机制，称为转导作用。在接合、转化、转导或转座过程中，不同 DNA 分子间发生的共价连接即为重组。

为研究基因的结构与功能，从构建的基因组 DNA 文库或 cDNA 文库分离、扩增某一感兴趣的基因就是基因克隆或分子克隆，又称重组 DNA 技术。一个完整的基因克隆过程应包括：目的基因的获取，克隆基因载体的选择与改造，目的基因与载体的连接，重组 DNA 分子导入受体细胞，筛选出含感兴趣基因的重组 DNA 转化细胞。实现上述过程需要一些重要的工具酶，如限制性内切核酸酶及连接酶等。限制性内切核酸酶是一类识别 DNA 特异序列的内切核酸酶。科学家感兴趣的外源基因又称目的基因；其来源有几种途

径：化学合成，酶促合成 cDNA，制备的基因组 DNA 及 PCR 技术。外源 DNA 离开染色体是不能复制的。将外源基因连接到复制子上，构建嵌合 DNA，外源基因即可作为复制子的一部分在宿主细胞复制。这种复制子就是克隆基因的载体。细菌质粒、噬菌体和一些病毒 DNA 均可被改造成基因克隆的载体。根据采用的克隆载体性质不同，将重组 DNA 分子导入细菌的方法有转化、转染及感染。将重组 DNA 分子导入受体菌后，通过适当形式的培养板生长即可获得一定的抗药菌落。利用原位杂交、Southern 印迹或免疫学方法对抗药菌落进行筛选，获得含目的基因的转化子菌落，再经扩增、分离重组 DNA，获得基因克隆。以上过程也可概括为“分、切、接、转、筛”。分离的克隆 cDNA 或基因与适当表达载体连接后可实现目的基因在 *E. coli* 或其他表达体系的表达。重组 DNA 技术在疾病基因的发现，表达有药用价值的蛋白质，DNA 诊断及疾病的预防等方面具有广泛应用价值，并促进了当代分子医学的诞生和发展。

（吴士良　贾弘禔）

第四篇 专 题 篇

本篇包括“细胞信息转导”、“血液的生物化学”、“肝的生物化学”、“维生素与微量元素”、“糖蛋白、蛋白聚糖与细胞外基质”、“癌基因、抑癌基因与生长因子”与“常用分子生物学技术的原理及其应用”，共七章。

前三篇内容从分子水平阐述了构成机体主要的生物大分子的结构与功能，重要的物质代谢以及基因信息的传递。除上述较系统的内容外，各种生理活动必须依赖的细胞信号转导，正常生理活动必需的维生素及微量元素、细胞外基质成分及其作用和若干组织的特殊生物化学作用等也是必不可少的生物化学内容。由于生物化学与分子生物学的迅速发展，正常细胞活动中癌基因、抑癌基因、生长因子的作用以及常用分子生物学技术在诊断和治疗中的应用等方面，也取得了长足进步。因此，将这些医学生必备的生化知识，归入专题篇加以叙述。

高等生物可由几亿个细胞组成一个整体。如此众多的细胞必须依赖细胞间的信息联系才能构成一个有生命活动的整体。机体各种信息的传递主要有神经和体液两条途径，只有在高级中枢的调节下彼此协调，才能维持机体的恒稳状态，适应各种生理活动的需要。癌基因和抑癌基因是一类主要调节细胞增殖分化的基因，在正常情况下对维持正常细胞功能具有重要作用。若这些基因结构和表达异常，有可能发生细胞癌变或其他疾病。绝大部分癌基因表达产物为具有调控细胞增殖、分化的生长因子及其受体，而生长因子受体所介导的信息传递途径是细胞间信息传递的重要途径之一。此外，激素或生长因子受体，糖蛋白聚糖和细胞黏附分子等是细胞间进行相互识别、结合的主要分子，也是细胞间信息转导的又一方式。细胞外基质种类丰富，不仅与细胞、组织形态形成有关，还发挥重要的信息转导作用，以调节细胞的增殖、分化等。

血液的有形成分可参与 O_2 与 CO_2 的运输和防御外源微生物入侵等。血液的可溶性蛋白质成分，更是种类繁多，功能多样，如输送物质，维持血液胶体渗透压，具有凝血和抗凝血的系统以维持血液在血管内流畅，调节免疫作用等。肝是有机体物质代谢的大本营，除在三大营养物质代谢中发挥重要作用外，还在维生素代谢、激素代谢、胆汁酸代谢和机体内外来源的非营养物质代谢方面起到至关重要的作用。分子生物学技术一章，将侧重介绍医学工作和科学文献所涉及的常用技术原理和应用，同时介绍在医学上的应用，即基因诊断和基因治疗的相关内容，它涉及诸多分子生物学技术。

本篇前四章的内容，大多数院校一般作为对本科生的基本要求进行讲授。其他各章多为进展性专题，各院校可根据实际情况选用，也可供学生自学或作为讲座用。

第十五章　细胞信息转导

细胞通讯(cell communication)是体内一部分细胞发出信号，另一部分细胞(target cell)接收信号并将其转变为细胞功能变化的过程。细胞针对外源信息所发生的细胞内生物化学变化及效应的全过程称为信号转导(signal transduction)。细胞通讯和信号转导过程是高等生物生命活动的基本机制。

第一节　细胞信号转导概述

细胞以多种方式感受内、外环境信号，并进行加工，通过检测、放大、整合细胞外环境中的多种信号，使细胞的代谢途径、基因转录、基因复制、细胞分裂等发生改变，以随时保证个体与环境的统一。细胞通讯和信号转导的基本路线和方式可以表示为：

细胞外信号 ⟶ 受体 ⟶ 细胞内多种分子的浓度、活性、位置变化 ⟶ 细胞应答反应

一、细胞外化学信号有可溶性和膜结合型两种形式

细胞主要感受化学信号，也可以感受物理信号。本章主要涉及细胞对化学信号的应答。

(一) 化学信号通讯存在从简单到复杂的进化过程

化学信号通讯（chemical signaling）的建立是生物为适应环境而不断变异、进化的结果。单细胞生物与外环境直接交换信息；多细胞生物中的单个细胞则不仅需要适应环境变化，而且需要细胞与细胞之间在功能上协调统一。最原始的通讯方式是细胞与细胞间通过孔道进行的直接物质交换，或者是通过细胞表面分子相互作用实现信息交流，这种调节方式至今仍然是高等动物细胞分化、个体发育及实现整体功能协调、适应的重要方式之一。但是，相距较远细胞之间的功能协调必须有可以远距离发挥作用的信号。

(二) 可溶性分子信号作用距离不等

多细胞生物中，细胞与邻近细胞或相对较远距离的细胞之间的信息交流主要是由细胞分泌的可溶性化学物质（蛋白质或小分子有机化合物）完成的。它们作用于周围的或相距较远的同类或其他类细胞（靶细胞），调节其功能，这种通讯方式称为化学通讯。

根据体内化学信号分子作用距离，可以将其分为内分泌信号（endocrine）、旁分泌信号（paracrine）和神经递质（neurotransmitter）等三大类（表 15-1）。有些旁分泌信号还作用于发出信号的细胞自身，称为自分泌（autocrine）。一些肿瘤细胞存在着生长因子的自分泌作用以保证持续增殖。

无论是激素还是细胞因子，在高等动物体内的作用方式都具有网络调节特点。体现在一种细胞因子或激素的作用始终会受到其他细胞因子或激素的影响，或抑制，或促进；发出信号的细胞随时又受到其他细胞信号的调节。网络调节使得机体内的细胞因子或激素的作用都具有一定程度的冗余和代偿性，单一缺陷不会导致对机体的严重损害。激素信号在细胞内的转导又在另一个层次上形成复杂的网络系统。

表 15-1　可溶性化学信号的分类

	神经分泌	内分泌	旁分泌及自分泌
化学信号的名称	神经递质	激素	细胞因子
作用距离	nm	m	m
受体位置	膜受体	膜或胞内受体	膜受体
举例	乙酰胆碱、谷氨酸	胰岛素、甲状腺素、生长激素	表皮生长因子、白细胞介素、神经生长因子

（三）细胞表面分子也是重要的细胞外信号

每个细胞都有众多的蛋白质、糖蛋白、蛋白聚糖等各类分子分布于细胞质膜的外表面，这些表面分子可以作为细胞的“触角”，与相邻细胞的膜表面分子特异性地识别和相互作用，达到功能上的相互协调。这种细胞通讯方式称为膜表面分子接触通讯，属于这一类通讯的有相邻细胞间黏附因子的相互作用、T 淋巴细胞与 B 淋巴细胞表面分子的相互作用等。

二、细胞经由特异性受体接收细胞外信号

（一）化学信号通过受体在细胞内转换和传递

受体（receptor）是细胞膜上或细胞内能识别外源化学信号并与之结合的成分，其化学本质是蛋白质，个别糖脂也具有受体作用。能够与受体特异性结合的分子称为配体（ligand）。细胞间化学信号就是一类最常见的配体。

受体有两个方面的作用：一是识别外源信号分子并与之结合；二是转换配体信号，使之成为细胞内分子可识别的信号，并传递至其他分子引起细胞应答。受体与配体的结合有以下特点：

1. 高度专一性　受体选择性地与特定配体结合，这种选择性是由分子的空间构象所决定的。一种信号分子到达细胞时，只作用于与之相应的受体，如果细胞没有相应受体，就不会对其发生反应。这种特异性的识别和结合保证了调控精确性。

2. 高度亲和力　体内化学信号存在浓度非常低（通常$\leqslant 10^{-8}$ mol/L），受体与信号分子的高亲和力保证了很低浓度的信号分子也可充分起到调控作用。

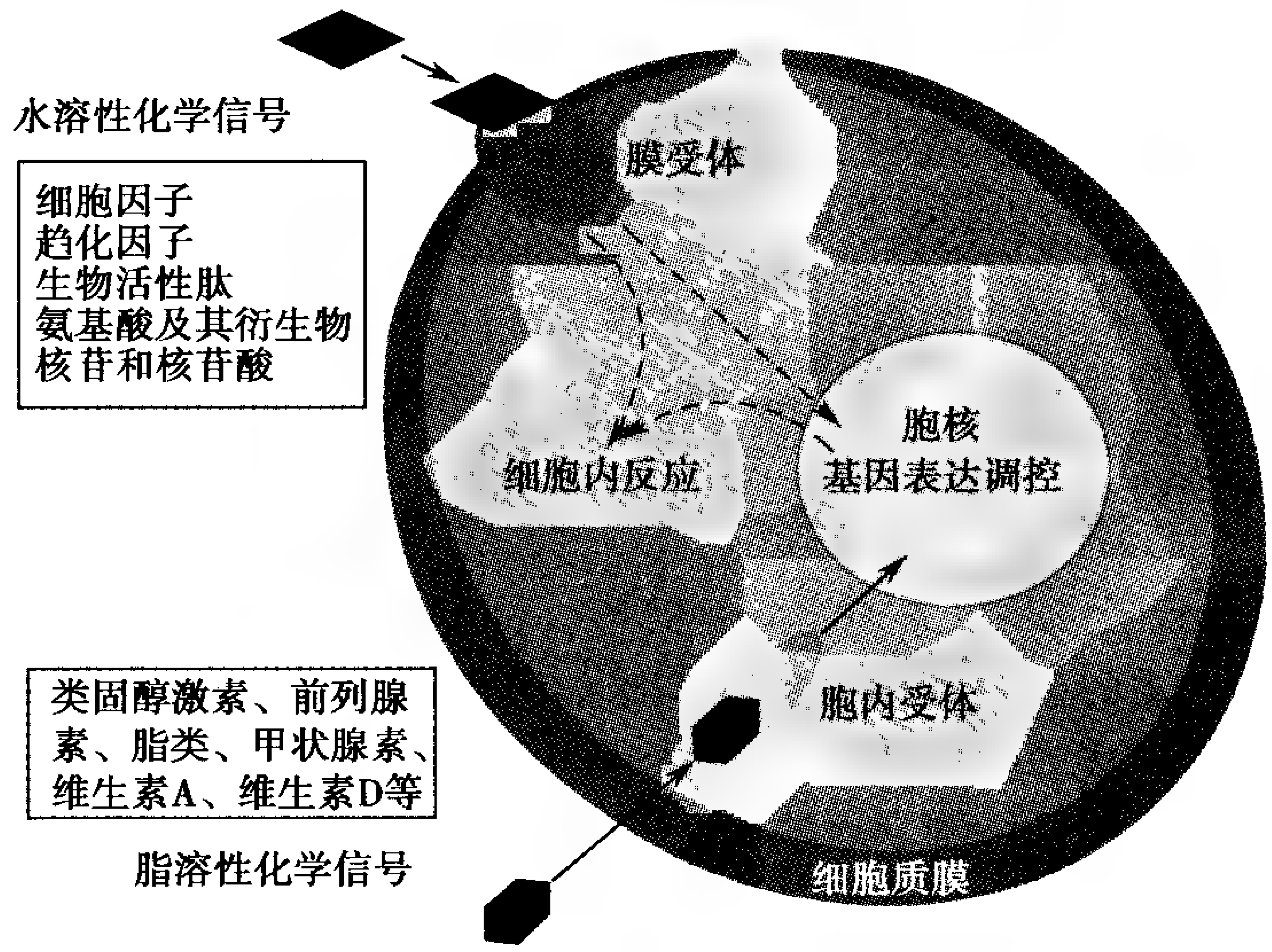
3. 可饱和性　受体-配体结合曲线（Scatchard 曲线）呈矩形双曲线。增加配体浓度，可使受体饱和。无论是细胞内还是细胞表面受体，数目都是有限的。当受体全部被配体占据时，再提高配体浓度也不会增加细胞的效应。

4. 可逆性　受体与配体以非共价键结合，当生物效应发生后，配体即与受体解离。受体可恢复到原来的状态再次接收配体信息。

5. 特定的作用模式　受体的分布和含量具有组织和细胞特异性，并呈现特定的作用模式，受体与配体结合后可引起某种特定的生理效应。

（二）受体既可以位于细胞膜也可以位于细胞内

按照其在细胞内的位置，受体分为细胞表面受体和细胞内受体。胞内受体接收的是可以直接通过脂双层质膜进入细胞的脂溶性化学信号，如类固醇激素、甲状腺素和维 A 酸等。胞膜表面受体接收的是不能进入细胞的水溶性化学信号（生长因子、细胞因子和水溶性激素等）和位于邻近细胞表面分子的信号（黏附分子等），需要一复杂的跨膜传递和转换过程（图 15-1）。受体在膜表面和细胞内的分布可以是区域性的，也可以是散在的。

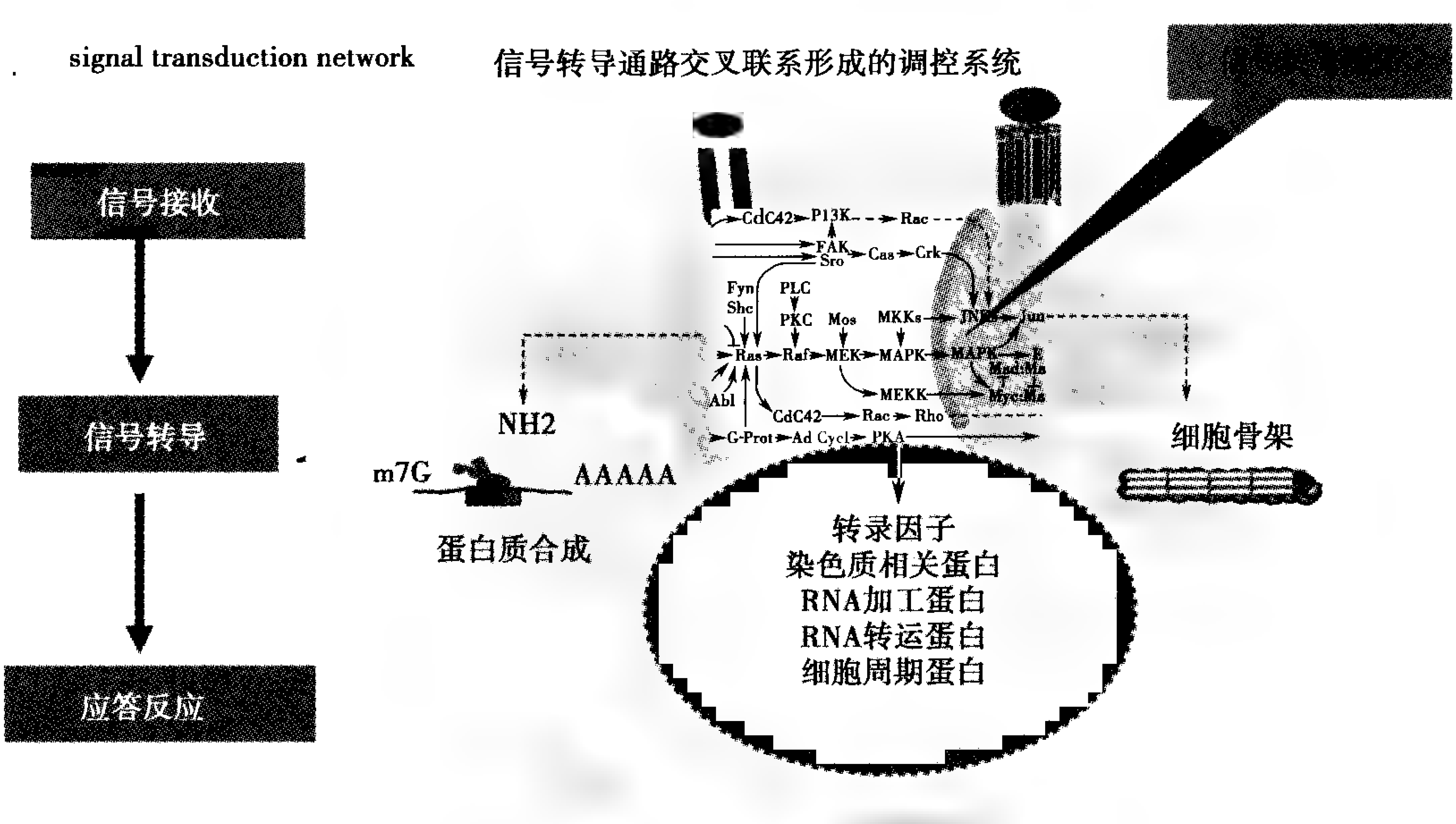


●图 15-1 水溶性和脂溶性化学信号的转导

三、细胞内信号分子结构、含量和分布变化是信号转导网络工作的基础

受体介导的跨细胞膜信号转导是一细胞内网络系统。构成这一网络系统的基础是一些蛋白质分子和小分子活性物质，这些蛋白质分子称为信号转导分子（signal transducer），小分子物质亦被称为第二信使（second messenger）。在细胞中，各种信号转导分子相互识别、相互作用将信号进行转换和传递，这种有序的分子变化被称为信号转导通路（signal

signal transducer	介导信号在细胞内传递的所有分子
signal transduction pathway	信号转导过程信号转导分子的排列方式
signal transduction network	信号转导通路交叉联系形成的调控系统



●图 15-2 细胞信号转导基本方式示意图

transduction pathway)。不同的信号转导通路之间发生交叉调控（crosstalking），形成复杂的信号转导网络（signal transduction network）系统（图 15-2）。信号转导通路和网络的形成是动态过程，将随着信号的种类和强度而不断变化。

细胞转导信号的基本方式包括：①改变细胞内各种信号转导分子的构象；②改变信号转导分子的细胞内定位；③促进各种信号转导分子复合物的形成或解聚；④改变小分子信使的细胞内浓度或分布等。

第二节　细胞内信号转导相关分子

1957 年，E. Sutherland 在研究肾上腺素促进肝糖原分解的机制时发现，这些激素的作用依赖于细胞产生一种小分子化合物环腺苷酸（cyclic AMP，cAMP），从而提出了 cAMP 是激素在细胞内的第二信使这一著名的激素信号跨膜传递学说。这是细胞信号转导领域中最具开创性的工作之一。50 年来，人们陆续发现了更多的小分子物质及多种蛋白质分子参加细胞跨膜信号转导通路。

一、第二信使的浓度和分布变化是重要的信号转导方式

细胞内小分子第二信使具有以下共同特点：①在完整细胞中，该分子的浓度或分布，在细胞外信号的作用下发生迅速改变；②该分子类似物可模拟细胞外信号的作用；③阻断该分子的变化可阻断细胞对外源信号的反应；④作为别位效应剂在细胞内有特定的靶蛋白分子。

第二信使在信号转导过程中的主要变化是浓度变化，这些变化可以用放射免疫、酶联免疫等方法进行分析。第二信使的浓度在细胞接收信号后变化非常迅速，可以在几分钟内被检测出来，并且在细胞内会很快被水解它们的酶清除，使信号迅速终止，细胞回到初始状态，再接受新的信号。催化第二信使生成和水解的酶都是膜受体信号转导通路中的重要信号转导分子。

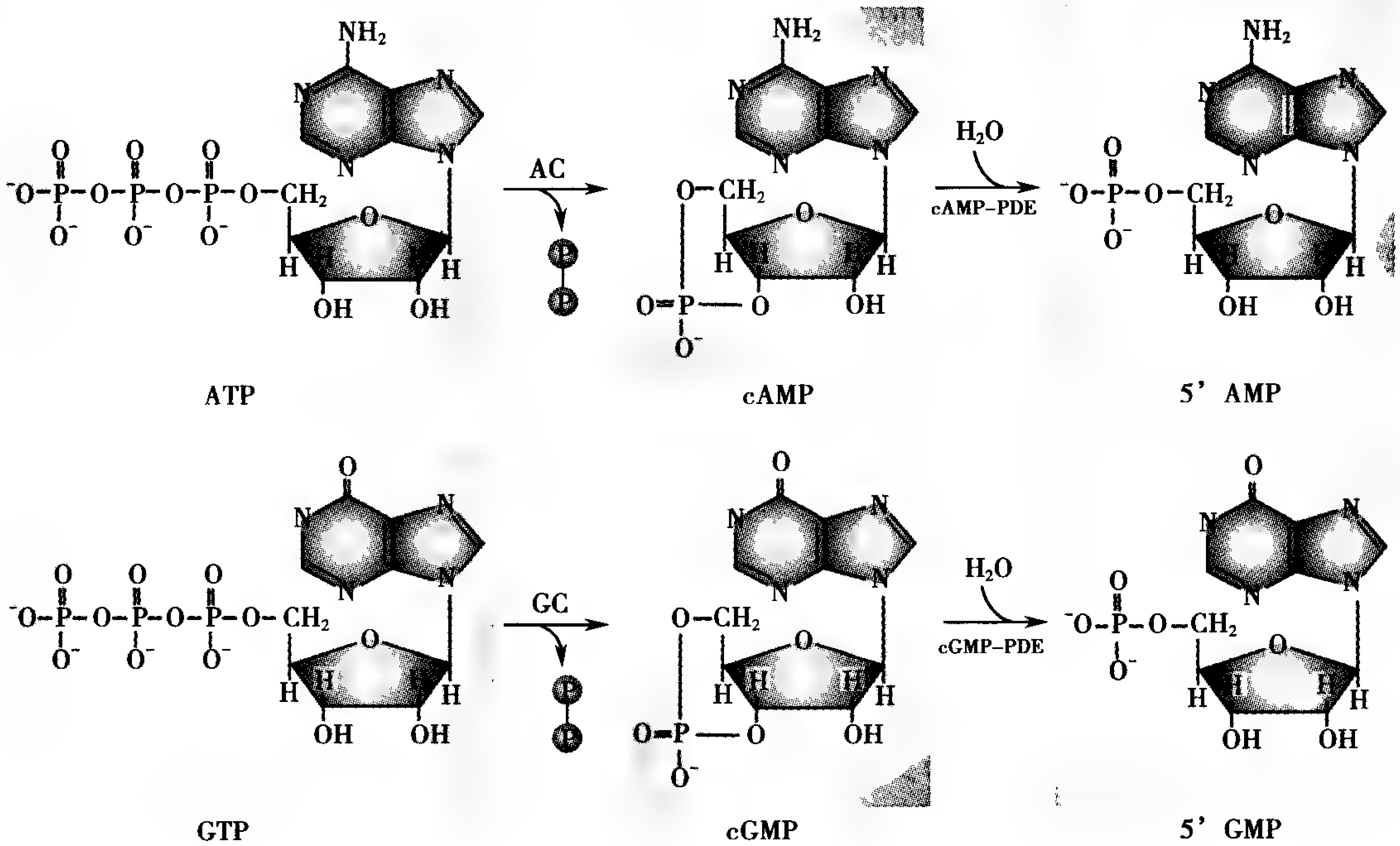
（一）环核苷酸是重要的细胞内第二信使

目前已知的细胞内环核苷酸类第二信使有 cAMP 和 cGMP 两种。它们的生成和水解过程如图 15-3 所示。

1. 核苷酸环化酶催化 cAMP 和 cGMP 生成　腺苷酸环化酶（adenylate cyclase，AC）为膜结合的糖蛋白，哺乳动物组织来源的 AC 至少有 8 型同工酶。鸟苷酸环化酶（guanylate cyclase，GC）则有两种形式，一种是膜结合型的受体分子；另一种存在于细胞质。细胞质中的 GC 含有血红素辅基，可直接受一氧化氮（NO）和相关化合物激活。

2. 细胞中存在多种催化环核苷酸水解的磷酸二酯酶（phosphodiester，PDE）　在脂肪细胞中，胰高血糖素在升高 cAMP 水平的同时会增加 PDE 活性，促进 cAMP 的水解，这种负反馈调节是维持 cAMP 稳定浓度的重要机制。PDE 对 cAMP 和 cGMP 的水解具有相对特异性。

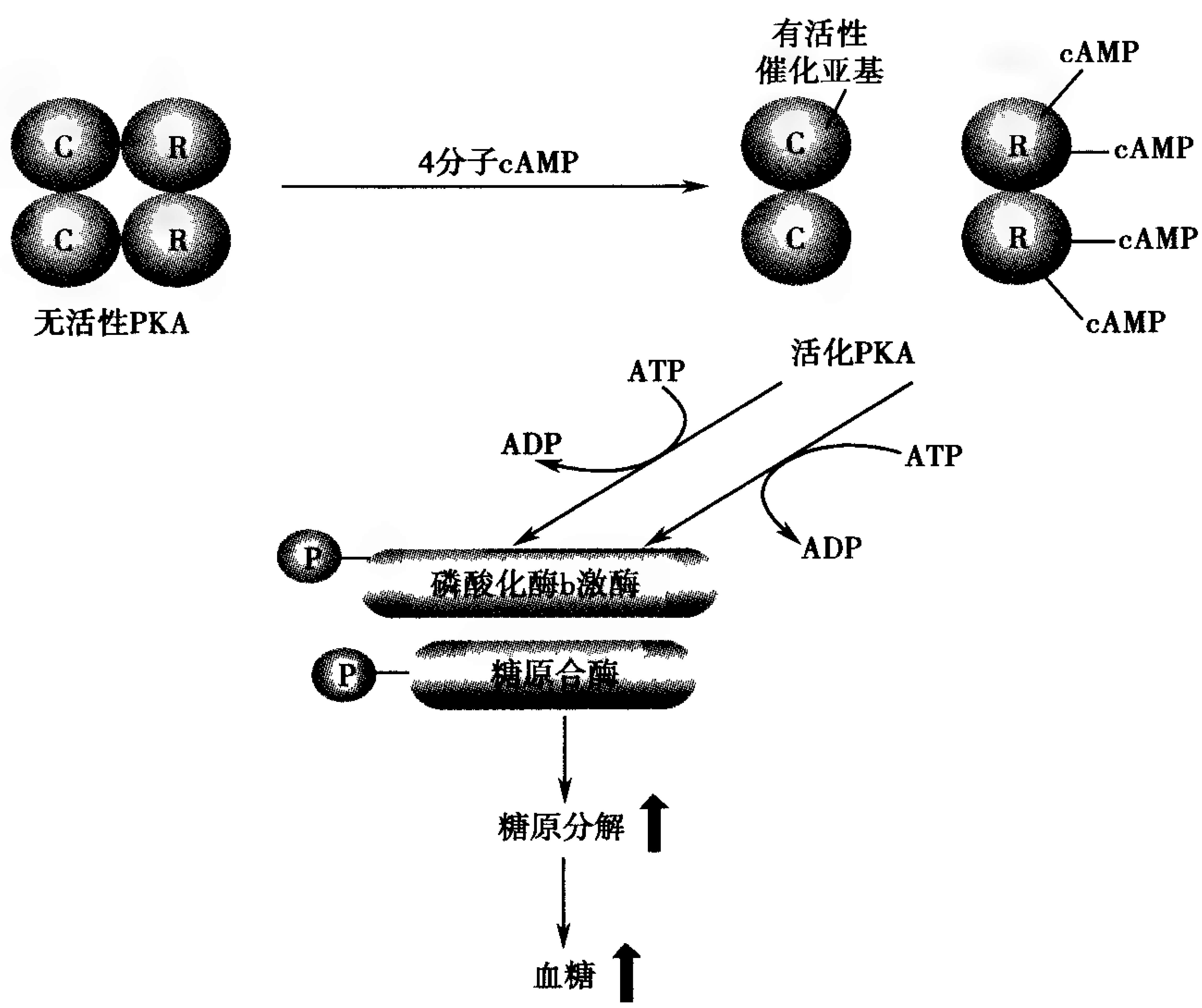
3. 环核苷酸在细胞内调节蛋白激酶活性　蛋白激酶（见后）是许多小分子第二信使直接作用的靶分子。cAMP 作用于 cAMP 依赖性蛋白激酶（cAMP-dependent protein kinase，cAPK），即蛋白激酶 A（protein kinase A，PKA）。PKA 属于丝（苏）氨酸蛋白激酶类，是由 2 个催化亚基（C）和 2 个调节亚基（R）组成的四聚体。四聚体的 PKA 无催化活性，这是由于 R 与 C 结合后抑制了催化活性。R 亚基是 cAMP 的靶蛋白，cAMP 与 R 结合后，解除了对 C 亚基的抑制作用，释放出 2 个游离的、具有催化活性 C 亚基（图



●图 15-3 cAMP 和 cGMP 的结构及其代谢

15-4）。PKA 活化后，可使多种蛋白质底物的丝氨酸或苏氨酸残基发生磷酸化，改变其活性状态，底物分子包括一些糖、脂代谢相关的酶类、离子通道和某些转录因子。

cGMP 作用于 cGMP 依赖性蛋白激酶（cGMP-dependent protein kinase，cGPK），即蛋白激酶 G（protein kinase G，PKG）。PKG 是由相同亚基构成的二聚体。与 PKA 不同，



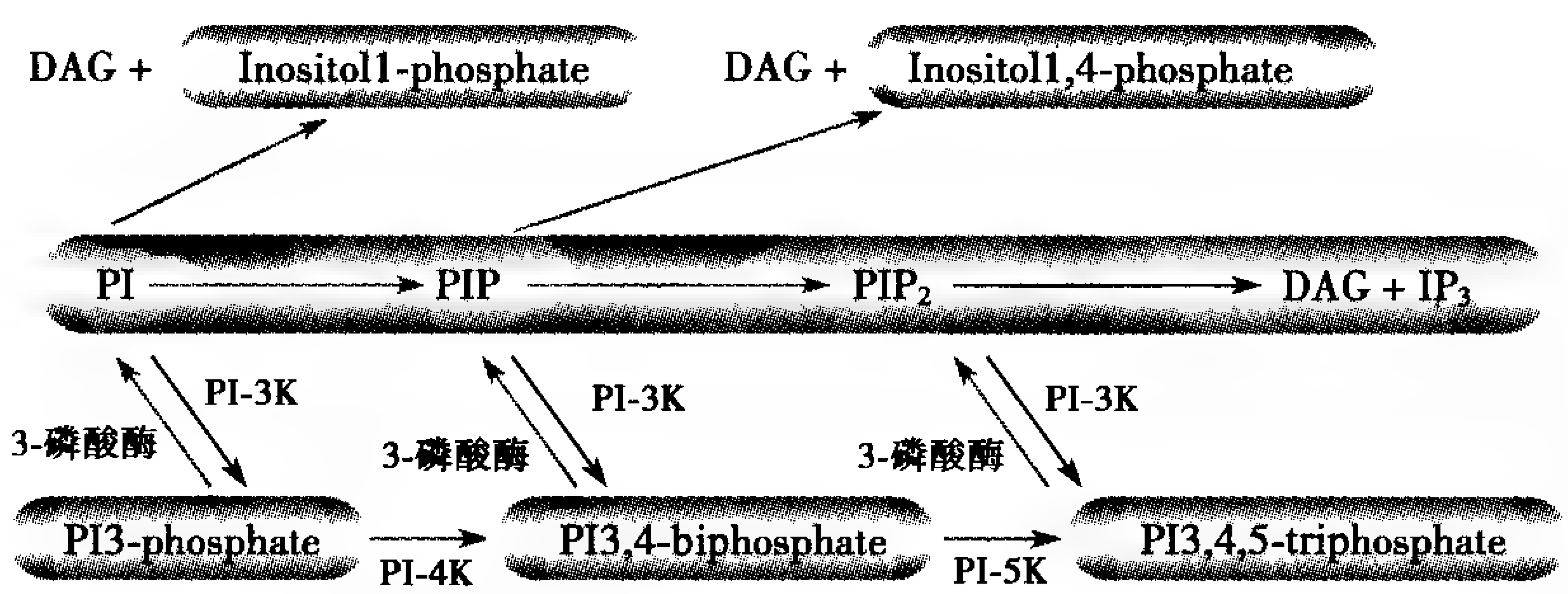
●图 15-4 cAMP 激活 PKA 示意图

PKG的调节结构域和催化结构域存在于同一个亚基内。PKG在脑组织和平滑肌中含量较丰富，在心肌及平滑肌收缩调节方面具有重要作用。

4. 蛋白激酶不是cAMP和cGMP的唯一靶分子　环核苷酸作为别位效应剂还可以作用于细胞内其他非蛋白激酶类分子。一些离子通道可以直接受cAMP或cGMP的别位调节。例如，视杆细胞膜上富含cGMP-门控阳离子通道，cGMP的结合使其开放；同样，嗅觉细胞内的cAMP增高时可使核苷酸-门控钙通道开放。

（二）脂类也可作为胞内第二信使

1. 磷脂酶和磷脂酰肌醇激酶催化生成脂类第二信使　磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C（phospholipase C，PLC）可将磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸（phosphatidyalinosital-4,5-diphosphate，PIP_2）分解成为重要的第二信使——二脂酰甘油（diacylglycerol，DAG）和肌醇三磷酸（inositol-1,4,5-triphosphate，IP_3）。磷脂酰肌醇激酶（phosphatidylinosital kinases，PIKs）催化磷脂酰肌醇（phosphatidyalinositol，PI）的磷酸化。根据肌醇环的磷酸化羟基位置不同，这类激酶有PI-3K、PI-4K和PI-5K等。磷脂酶和磷脂酰肌醇激酶催化产生的第二信使如图15-5所示。



●图15-5　磷脂酶和磷脂酰肌醇激酶催化脂类第二信使的生成

近年来，除肌醇磷脂外，更多的甘油磷脂类小分子已经被发现具有第二信使作用，一些鞘磷脂衍生物的第二信使作用也受到关注。例如，由神经鞘磷脂衍生的神经酰胺（ceramide）对细胞凋亡信号转导具有调节作用。

2. 脂类第二信使作用于相应的靶蛋白分子　IP_3是水溶性分子，可在细胞内扩散至内质网或肌质网膜上，并与其受体结合。IP_3的受体是IP_3控制的Ca^{2+}通道，结合IP_3后开放，促进细胞钙库内的Ca^{2+}迅速释放，细胞中局部Ca^{2+}浓度迅速升高。DAG为脂溶性分子，生成后仍留在质膜上。DAG和钙离子在细胞内的靶分子之一是蛋白激酶C（protein kinase C，PKC）。该酶的催化区与PKA的催化亚基结构类似，属于丝/苏氨酸蛋白激酶。目前发现的PKC同工酶有12种以上，不同的同工酶有不同的酶学特性、特异的组织分布和亚细胞定位，对辅助激活剂的依赖性亦不同。PKC作用的底物蛋白质包括质膜受体、膜蛋白、多种酶和转录因子等，参与多种生理功能的调节。

（三）钙离子可以激活信号转导有关的酶类

1. 钙离子在细胞中的分布具有明显的区域特征　细胞外液游离钙浓度远高于细胞内液，且90%以上储存于细胞内钙库（内质网和线粒体内）。因此，只要质膜或细胞内钙库的Ca^{2+}通道稍开启，即可引起细胞内液局部Ca^{2+}浓度的急剧升高，引发一系列连锁反应和生理效应，故Ca^{2+}是细胞内重要的第二信使。导致细胞质游离Ca^{2+}浓度升高的反应有两种：一是细胞质膜钙通道开放，引起钙内流；二是细胞内钙库膜上的钙通道开放，引起钙释放。胞液Ca^{2+}可以再经由细胞质膜及钙库膜上的钙泵（Ca^{2+}-ATP酶）返回细胞外或细胞内钙库，以消耗能量的方式维持细胞质内的低钙状态。

2. 钙离子的信号功能主要是通过钙调蛋白实现 钙调蛋白（calmodulin，CaM）可看作是细胞内 Ca^{2+} 的受体（肌收缩除外）。每分子 CaM 可结合 4 个 Ca^{2+}，结合后被激活，可作用于钙调蛋白依赖性蛋白激酶。此外 Ca^{2+} 还可直接激活 PKC、AC 和 cAMP-PDE 等多种信号转导分子。

（四）NO 的信使功能与 cGMP 相关

1980 年，美国药理学家 Furchgott 发现乙酰胆碱使血管平滑肌松弛的机制是由于血管内皮细胞释放了一种称为内皮源性松弛因子（endothelium-derived relaxing factor，EDRF）并进入相邻平滑肌细胞，在平滑肌细胞内，EDRF 激活鸟苷酸环化酶，导致 cGMP 水平升高；cGMP 激活 PKG，后者可使平滑肌中的靶蛋白磷酸化，引起肌松弛。出人意料的是，EDRF 最后被确认是一氧化氮（nitric oxide，NO）分子。

NO 在细胞内由 NO 合酶（nitric oxide synthase，NOS）催化生成，底物分子是精氨酸，产物是胍氨酸和 NO。目前已知有三种形式的 NO 合酶，即 NOSⅠ、NOSⅡ和 NOSⅢ。NOSⅠ主要分布于外周神经、中枢神经系统和肾；NOSⅡ广泛分布在肝、心肌、血管平滑肌、免疫细胞和成纤维细胞等。NOSⅢ分布于内皮细胞、心肌细胞和脑。NO 的生理调节作用主要通过激活鸟苷酸环化酶、ADP 核糖转移酶和环氧化酶完成。

除了 NO 以外，CO（carbon monoxide）、H_2S（sulfureted hydrogen）的第二信使作用近年来也得到证实。

二、蛋白质作为细胞内信号转导分子

信号转导分子大部分是蛋白质，包括酶分子、调节蛋白和转录因子等，它们构成信号转导通路上的各种开关和接头。

（一）蛋白激酶/蛋白磷酸酶是信号通路开关分子

1. 蛋白质的可逆磷酸化修饰是最重要的信号通路开关 蛋白激酶（protein kinase，PK）与蛋白磷酸酶（protein phosphatase，PP）催化蛋白质的可逆性磷酸化修饰。这一调节方式最初在研究糖原磷酸化酶的活性形式和非活性形式的转换过程中被发现。蛋白质的磷酸化修饰可能提高其活性，也可能降低其活性，取决于构象变化是否有利于反应的进行。

2. 蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶和蛋白酪氨酸激酶是主要的蛋白激酶 蛋白激酶是催化 ATP 的 γ 磷酸基转移至靶蛋白的特定氨基酸残基上的一类酶。业已发现的几类蛋白激酶如表 15-2。目前对蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶和蛋白酪氨酸激酶类的结构与功能了解较多。

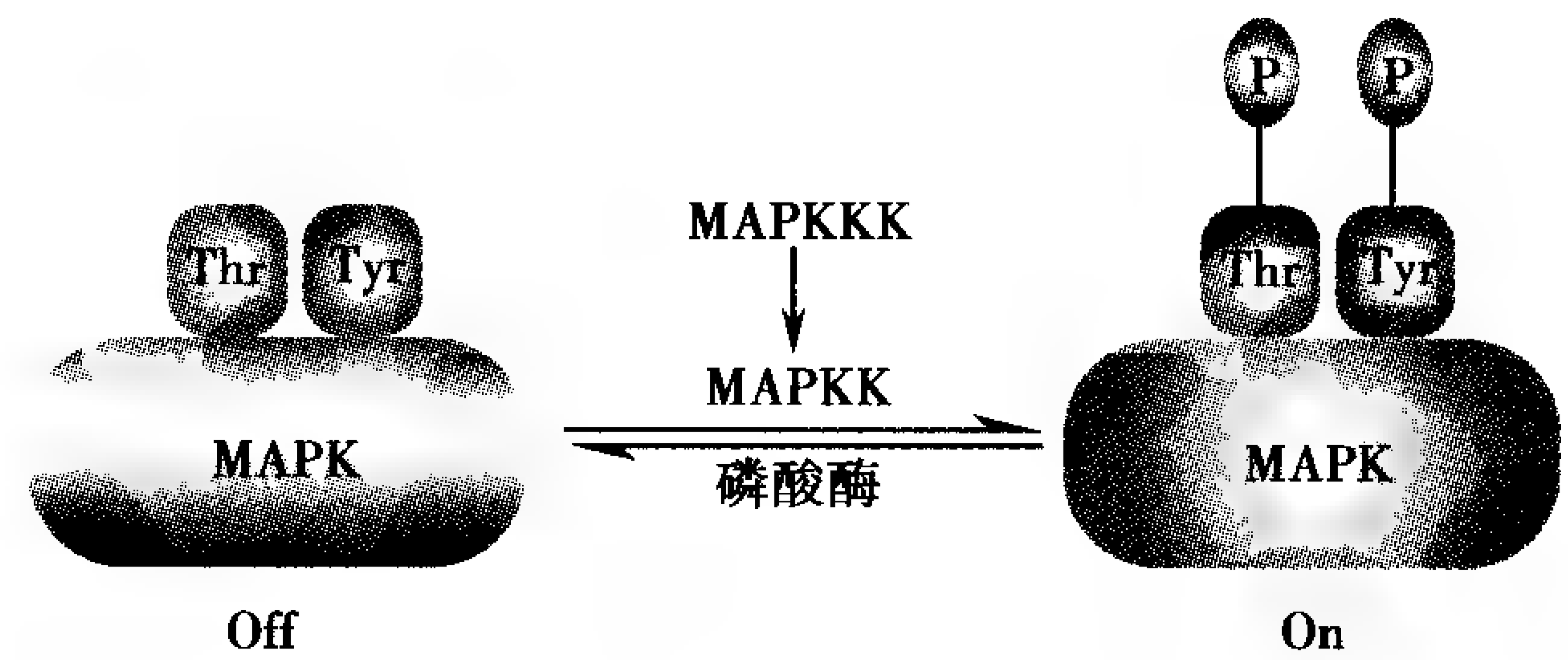
表 15-2 蛋白激酶的分类

激 酶	磷酸基团的受体
蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶	丝氨酸/苏氨酸羟基
蛋白酪氨酸激酶	酪氨酸的酚羟基
蛋白组/赖/精氨酸激酶	咪唑环、胍基、ε-氨基
蛋白半胱氨酸激酶	巯基
蛋白天冬氨酸/谷氨酸激酶	酰基

蛋白激酶种类繁多，至 2004 年底已发现了 800 余种。细胞内重要的蛋白丝/苏氨酸激

酶包括受环核苷酸调控 PKA 和 PKG、受 DAG/Ca^{2+} 调控的 PKC、受 Ca^{2+}/CaM 调控的 Ca^{2+}/CaM-PK、受 PIP_3 调控的 PKB、受细胞周期蛋白调控的细胞周期蛋白依赖蛋白激酶（cyclin dependent protein kinase，CDK）以及丝裂原激活的蛋白激酶（mitogen activated protein kinases，MAPK）等。细胞内还有多种蛋白酪氨酸激酶。PKA、PKG、PKC 和 Ca^{2+}/CaM-PK 已经在前一节中作为第二信使的靶蛋白分子涉及，这里仅介绍对细胞增殖、分化至关重要的 MAPK 和蛋白酪氨酸激酶。

3. MAPK 级联激活是多种信号通路的中心　MAPK 属于蛋白丝/苏氨酸激酶类，是接收膜受体转换与传递的信号并将其带入细胞核内的一类重要分子，在许多细胞增殖相关信号通路中具有关键作用。在未受刺激的细胞内，MAPK 处于静止状态。细胞受到生长因子或其他因素刺激后，MAPK 接受上游分子 MAPKK（MAP kinase kinase）和 MAPKKK（MAP kinase kinase kinase）的活化信号而激活（图 15-6），表现为逐级磷酸化。MAPK 家族成员的活化需要分子中一个 Thr-X-Tyr 模体中的 Tyr 和 Thr 残基同时磷酸化，这两个残基的磷酸化是由 MAPKK 单独完成的，因此，MAPKK 属于丝/苏氨酸和酪氨酸双功能激酶。MAPK 被激活后转移至细胞核内，使一些转录因子发生磷酸化，改变细胞内基因表达状态。另外，它也可以使一些其他的酶发生磷酸化使之活性改变。



●图 15-6　MAPK 的磷酸化及活化示意图

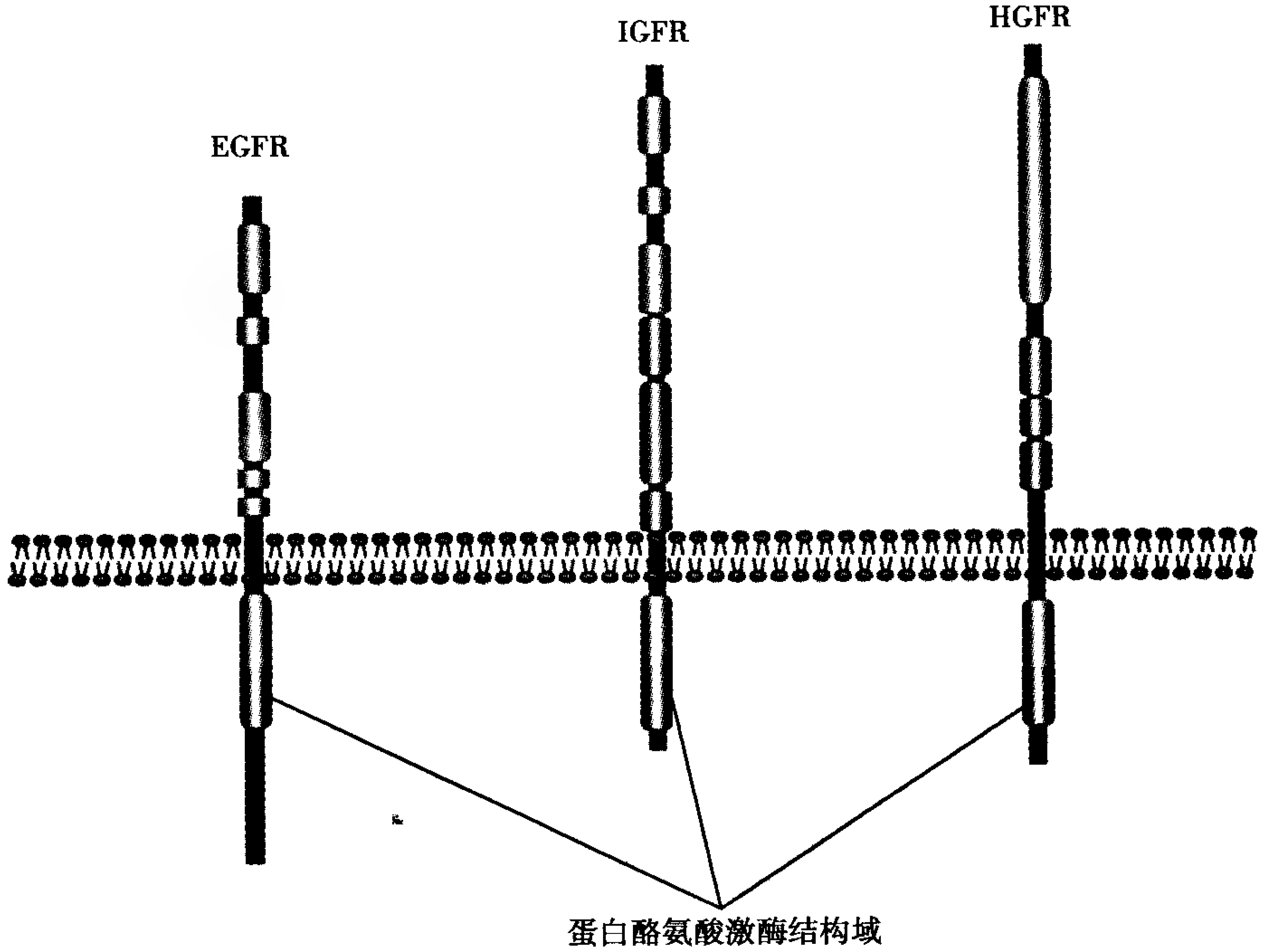
哺乳动物细胞的 MAPK 家族中最重要的有 ERK（extracellular regulated kinase）、JNK/SAPK（c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase）和 P38-MAPK 等 3 个亚家族。ERK 广泛存在于各种组织，参与细胞增殖与分化的调控。多种生长因子受体、营养相关因子受体等都需要 ERK 的活化来完成信号转导过程。JNK 家族是细胞对各种应激原诱导的信号转导的关键分子，参与细胞对辐射、渗透压、温度变化等应激反应。P38-MAPK 亚家族介导炎症、凋亡等应激反应，因而成为开发抗炎药物的靶位。可被 MAPK 家族成员磷酸化的底物大部分是转录因子、蛋白激酶等。

4. 蛋白酪氨酸激酶转导细胞增殖与分化信号　蛋白质酪氨酸激酶（protein tyrosine kinase，PTK）催化蛋白质分子中的酪氨酸残基磷酸化。酪氨酸磷酸化大部分对细胞增殖具有正向调节作用，无论是生长因子作用后正常细胞的增殖、恶性肿瘤细胞的增殖，还是 T 细胞、B 细胞或肥大细胞的活化都伴随着瞬间发生的多种蛋白质分子的酪氨酸磷酸化。PTK 抑制剂可阻断上述细胞反应。例如，属于 PTK 表皮生长因子受体的抑制剂已经在临床上用于肿瘤治疗。

（1）部分位于细胞膜的生长因子类受体属于 PTK。这些受体被称为受体型 PTK。它们在结构上均为单次跨膜蛋白质，其胞外部分为配体结合区，中间有跨膜区，细胞内部分含有 PTK 的催化结构域（图 15-7）。

受体型 PTK 与配体结合后，将形成二聚体，同时酶活性增高，使受体胞内部分的酪氨酸磷酸化增强，磷酸化的受体酶活性又进一步增强。此外更重要的是，磷酸化的受体募集含有 SH2 结构域（见后）的信号分子，从而将信号传递至下游分子。

（2）细胞质内有多种非受体型的 PTK，主要作用是作为受体和效应分子之间的信号转导分子。这些 PTK 或者直接与受体相结合而成为转导受体信号的一分子，如 Src 家族成员、JAK 家族；有的与活化后的受体结合或者间接地结合于其他信号转导分子而发挥信号转导作用。非受体型 PTK 的主要作用见表 15-3。



●图 15-7 部分受体型 PTK 结构示意图
EGFR：epidermal growth factor receptor，表皮生长因子受体
IGFR：insulin-like growth factor receptor，胰岛素样生长因子受体
HGFR：hepatocyte growth factor receptor，肝细胞生长因子受体

表 15-3 非受体型 PTK 的主要作用

基因家族名称	举例	细胞内定位	主要功能
Src 家族	Src、Fyn、Lck、Lyn 等	常与受体结合存在于质膜内侧	接受受体传递的信号发生磷酸化而激活，通过催化底物的酪氨酸磷酸化向下游传递信号
ZAP70 家族	ZAP70、Syk	与受体结合存在于质膜内侧	接受 T 淋巴细胞的抗原受体或 B 淋巴细胞的抗原受体的信号
Tec 家族	Btk、Itk、Tec 等	存在于细胞质	位于 ZAP70 和 Src 家族下游接受 T 淋巴细胞的抗原受体或 B 淋巴细胞的抗原受体的信号
JAK 家族	JAK1、JAK2、JAK3 等	与一些白细胞介素受体结合存在于质膜内侧	介导白细胞介素受体活化信号
核内 PTK	Abl、Wee	细胞核	参与转录过程和细胞周期的调节

5. 蛋白磷酸酶衰减蛋白激酶信号 蛋白质磷酸（酯）酶（phosphatidase）催化磷酸化的蛋白质分子发生去磷酸化，与蛋白激酶共同构成了蛋白质活性的开关系统。无论蛋白激酶对于其下游分子的作用是正调节还是负调节，蛋白磷酸酶都将对蛋白激酶所引起的变化产生衰减信号。

蛋白磷酸酶的分类也是根据它所作用的氨基酸残基决定的。目前已知的蛋白磷酸酶包括蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸酶和蛋白酪氨酸磷酸酶两大类。另外还有个别的蛋白磷酸酶具有双重作用，即可同时作用于酪氨酸和丝/苏氨酸残基。

各种蛋白激酶和蛋白磷酸酶在细胞内仅仅选择性作用于有限的底物，它们的催化作用特异性及其在细胞内的分布特异性决定了信号转导途径的精确性。

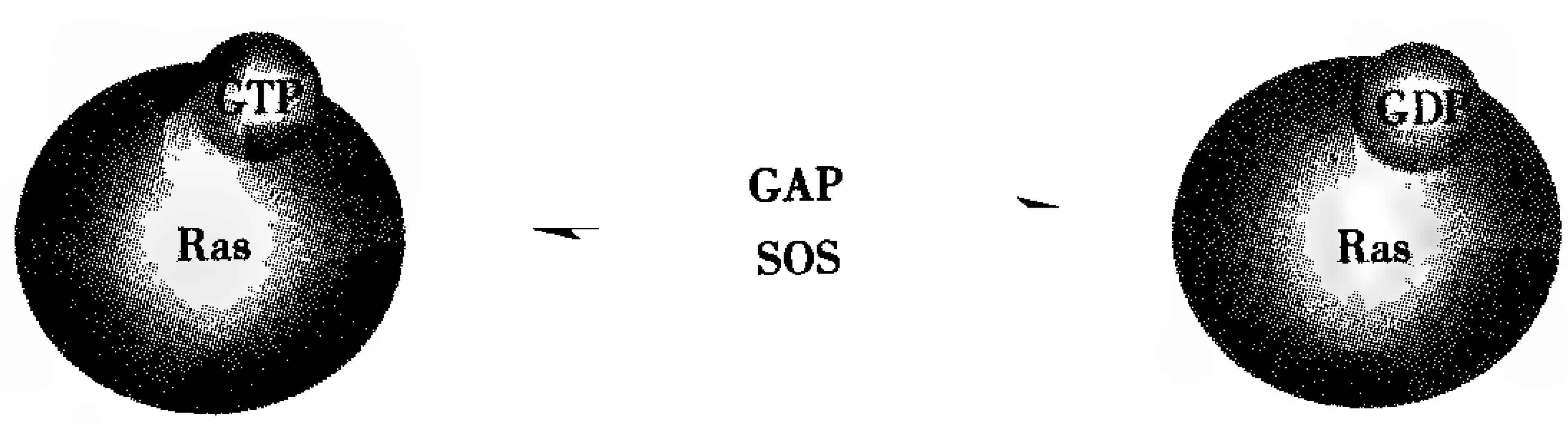
（二）G 蛋白的 GTP/GDP 结合状态决定信号通路的开关

另外一类重要的信号通路开关是鸟苷酸结合蛋白（guanine nucleotide binding protein，G protein）简称 G 蛋白，亦称 GTP 结合蛋白。G 蛋白的共同特点是结合的核苷酸为 GTP 时处于活化形式，作用于下游分子使相应信号途径开放。这些 G 蛋白自身均具有 GTP 酶活性，可将结合的 GTP 水解为 GDP，回到非活化状态，使信号途径关闭。目前已知的 G 蛋白主要有两大类。

1. 介导七跨膜受体信号转导的异源三聚体 G 蛋白　这是一类与七跨膜受体相结合的 G 蛋白，以 αβγ 三聚体的形式存在于细胞质膜内侧，目前已发现 20 余种。其中的 α 亚基具有与受体结合并受其活化调节以及与下游效应分子相互作用的作用，且具有 GTP 酶活性。βγ 亚基在细胞内形成紧密结合的二聚体，只有在蛋白质变性条件下方可解离，因此可以认为它们是功能上的单体。异源三聚体 G 蛋白是直接接受 G 蛋白偶联受体信号的分子（详见第三节），并开放各种下游效应分子，如离子通道、AC、PLC 等的联系，调节各种细胞功能。

2. 重要的信号转导分子——低分子质量 G 蛋白　另一类 G 蛋白是低分子质量 G 蛋白（21kD），它们在多种细胞信号转导途径中亦具有开关作用。Ras 是第一个被发现的低分子质量 G 蛋白，因此这类蛋白质被称为 Ras 超家族，因为它们均由一个 GTP 酶结构域构成，故又称 Ras 样 GTP 酶。目前已知的 Ras 家族成员已超过 50 种，在细胞内分别控制不同的信号转导途径。例如，位于 MAPK 系统的上游的 Ras，在外源信号的作用下成为 GTP 结合形式时，可使位于下游的 MAPK 系统活化。

在细胞中存在一些专门控制低分子量 G 蛋白活性的调节因子（图 15-8）。其中，有的可增强其活性，如鸟嘌呤核苷酸交换因子（guanine nucleotide exchange factor，GEF）；有的可以降低其活性，如 GTP 酶活化蛋白（GTPase activating protein，GAP）等。

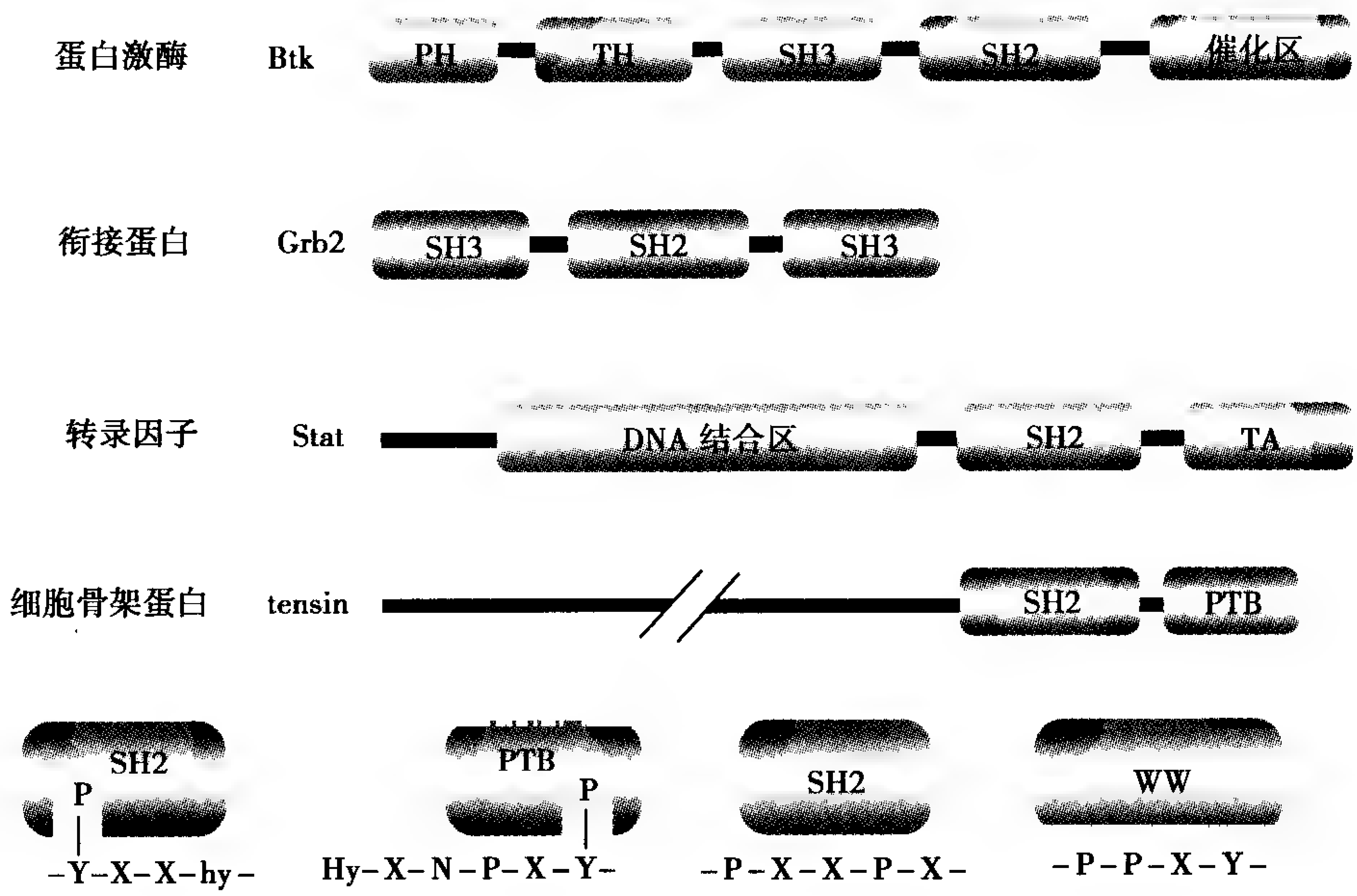


●图 15-8　Ras 的活化及其调控因子

（三）蛋白质相互作用结构域介导信号通路中蛋白质的相互作用

信号转导分子在活细胞内接收和转导信号的过程是由多种分子聚集形成的信号转导复合物（signaling complex）完成的。信号转导复合物是信号转导通路和信号转导网络的结构基础。信号转导复合物的形成是一个动态过程，针对不同外源信号，聚合形成不同成分的复合物。信号转导复合物的存在保证了信号转导的特异性和精确性，同时也增加了调控的层次，增加了维持机体稳态平衡的机会。

信号转导复合物形成的基础是蛋白质相互作用。蛋白质相互作用的结构基础则是各种蛋白质分子中的蛋白质相互作用结构域（protein interaction domain）。这些结构域大部分由 50～100 个氨基酸构成，其特点是（图 15-9）：①一个信号分子中可含有两种以上的蛋白质相互作用结构域，因此可同时与两种以上的其他信号分子结合；②同一类蛋白质相互作用结构域可存在于多种不同的分子中。这些结构域的一级结构不同，因此对所结合的信号分子具有选择性；③这些结构域均为非催化结构域。目前已经确认的蛋白质相互作用结构域已经超过 40 种，表 15-4 列举了主要的几种蛋白质相互作用结构域以及它们识别和结合的模体。



●图 15-9 信号转导分子中的蛋白质相互作用结构域的分布及作用

表 15-4 蛋白质相互作用结构域及其识别模体举例

蛋白质相互作用结构域	缩写	存在分子种类	识别模体
Src homology 2	SH2	蛋白激酶、磷酸酶、衔接蛋白等	含磷酸化酪氨酸模体
Src homology 3	SH3	衔接蛋白、磷脂酶、蛋白激酶等	富含脯氨酸模体
Pleckstrin homology	PH	蛋白激酶、细胞骨架调节分子等	磷脂衍生物
Protein tyrosine binding	PTB		含磷酸化酪氨酸模体

(四) 衔接蛋白和支架蛋白连接信号通路与网络

1. 衔接蛋白连接信号转导分子 衔接蛋白（adaptor protein）是信号转导通路中不同信号转导分子的接头，连接上游信号转导分子与下游信号转导分子。衔接蛋白发挥作用的结构基础是含有蛋白质相互作用结构域，功能是募集和组织信号转导复合物。

大部分衔接蛋白由 2 个或 2 个以上的蛋白质相互作用结构域构成，除此以外几乎不含有其他功能结构。例如表皮生长因子受体信号转导通路中的衔接蛋白 Grb2 就是由 1 个 SH2 结构域和 2 个 SH3 结构域构成的衔接蛋白，可以与多种信号转导分子结合。

2. 支架蛋白保证特异和高效的信号转导 支架蛋白（scaffolding proteins）一般是分子质量较大的蛋白质，可同时结合多个位于同一信号转导通路中的转导分子。信号转导分子结合在支架蛋白上的意义有：①保证相关信号转导分子容纳于一个隔离而稳定的信号转导通路内，避免与其他不需要的信号转导通路发生交叉反应，以维持信号转导通路的特异性；②增加了调控复杂性和多样性。

第三节 各种受体介导的细胞内基本信号转导通路

前已述及，接受细胞外信号的受体有的位于细胞表面，有的位于细胞内。脂溶性化学信号的主要受体位于细胞质或细胞核内。细胞膜表面受体接收的则是不能进入细胞的水溶性化学信号分子和其他细胞表面的信号分子。根据结构、接收信号的种类、转换信号方式

等差异，膜表面受体又可分为离子通道受体、七跨膜受体（G-蛋白偶联受体）和单跨膜受体（酶偶联受体）等三种类型（表 15-5）。

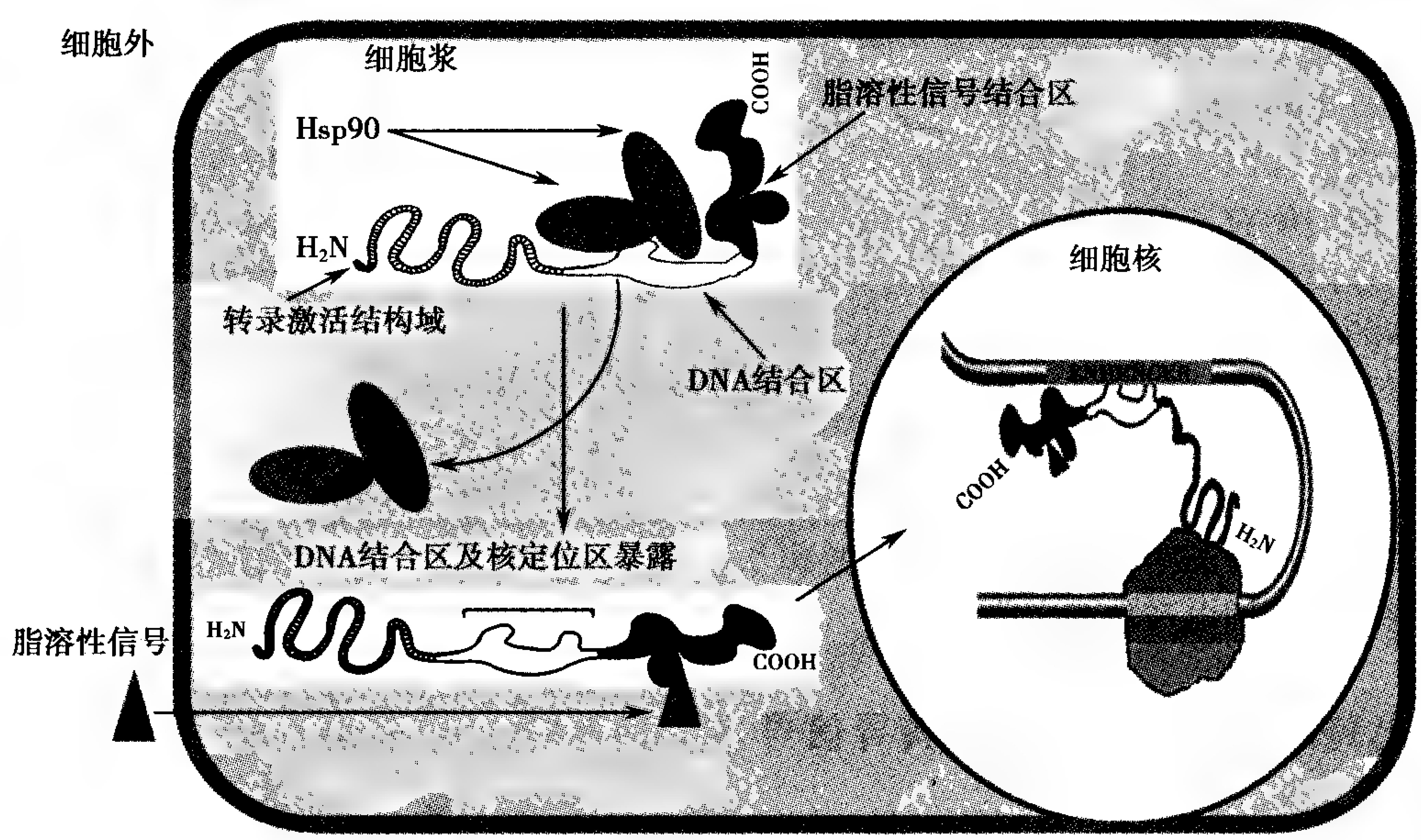
表 15-5　三种膜受体的结构和功能特点

特性	离子通道受体	七跨膜受体	单跨膜受体
内源性配体	神经递质	神经递质 激素 趋化因子 外源刺激（味、光）	生长因子 细胞因子
结构	寡聚体形成的孔道	单体	具有或不具有催化活性的单体
跨膜区段数目	4 个	7 个	1 个
功能	离子通道	激活 G 蛋白	激活蛋白激酶
细胞应答	去极化与超极化	去极化与超极化 调节蛋白质功能和表达水平	调节蛋白质的功能和表达水平，调节细胞分化和增殖

虽然受体各自具有特定的作用模式和信号转导机制，但是它们常共用一些细胞内的信号转导分子，并利用一些共同的信号转导通路传递信号。这里将以几类不同受体所介导的信号转导通路为例，介绍细胞内的基本信号转导通路。需要指出的是，这里所涉及的仅仅是细胞内众多信号转导通路中的几个典型例子，实际过程要复杂得多，人们尚未达到完全认识其规律的境界。

一、细胞内受体多属于转录因子

位于细胞内的受体多为转录因子（图 15-10），当与相应配体结合后，能与 DNA 的顺式作用元件结合，在转录水平调节基因表达。能与该型受体结合的信息物质有类固醇激



●图 15-10　核受体结构及作用机制示意图

胞内受体通常为 400～1000 个氨基酸残基组成的单体蛋白质，由 4 个区域构成。高度可变区位于 N 末端具有转录激活功能；DNA 结合区位于受体分子的中部，含两个锌指模体与 DNA 结合；铰链区有核定位信号引导受体进入细胞核；激素结合区位于 C 末端

素、甲状腺素、维A酸和维生素D等，它们进入细胞后，有些可与其位于细胞核内的受体相结合形成激素-受体复合物，有些则先与其在细胞质内的受体相结合，然后以激素-受体复合物的形式穿过核孔进入核内。

在没有激素存在时，受体往往与具有抑制其作用的蛋白质分子，如热休克蛋白（heat shock protein，HSP）形成复合物，阻止了受体向细胞核的移动及其与DNA的结合。当激素与受体结合后，受体构象发生变化，导致热休克蛋白解聚，暴露出受体的核内转移部位及DNA结合部位，激素-受体复合物向核内转移，并结合于其靶基因邻近的激素反应元件（hormone response element，HRE）上，进而改变细胞的基因表达谱（图15-10）。不同的激素-受体复合物结合于不同的激素反应元件（表15-6）。结合于激素反应元件的激素-受体复合物再与位于启动子区域的基本转录因子及其他的转录调节分子作用，从而开放或关闭其下游基因。

表15-6 激素反应元件举例

激素举例	受体所识别的DNA特征序列
肾上腺皮质激素	5′ AGAACAXXXTGTTCT 3′ 3′ TCTTGTXXXACAAGA 5′
雌激素	5′ AGGTCAXXXTGACCT 3′ 3′ TCCAGTXXXACTGGA 5′
甲状腺素	5′ AGGTCATGACCT 3′ 3′ TCCAGTACTGGA 5′

二、离子通道型膜受体是化学信号与电信号转换器

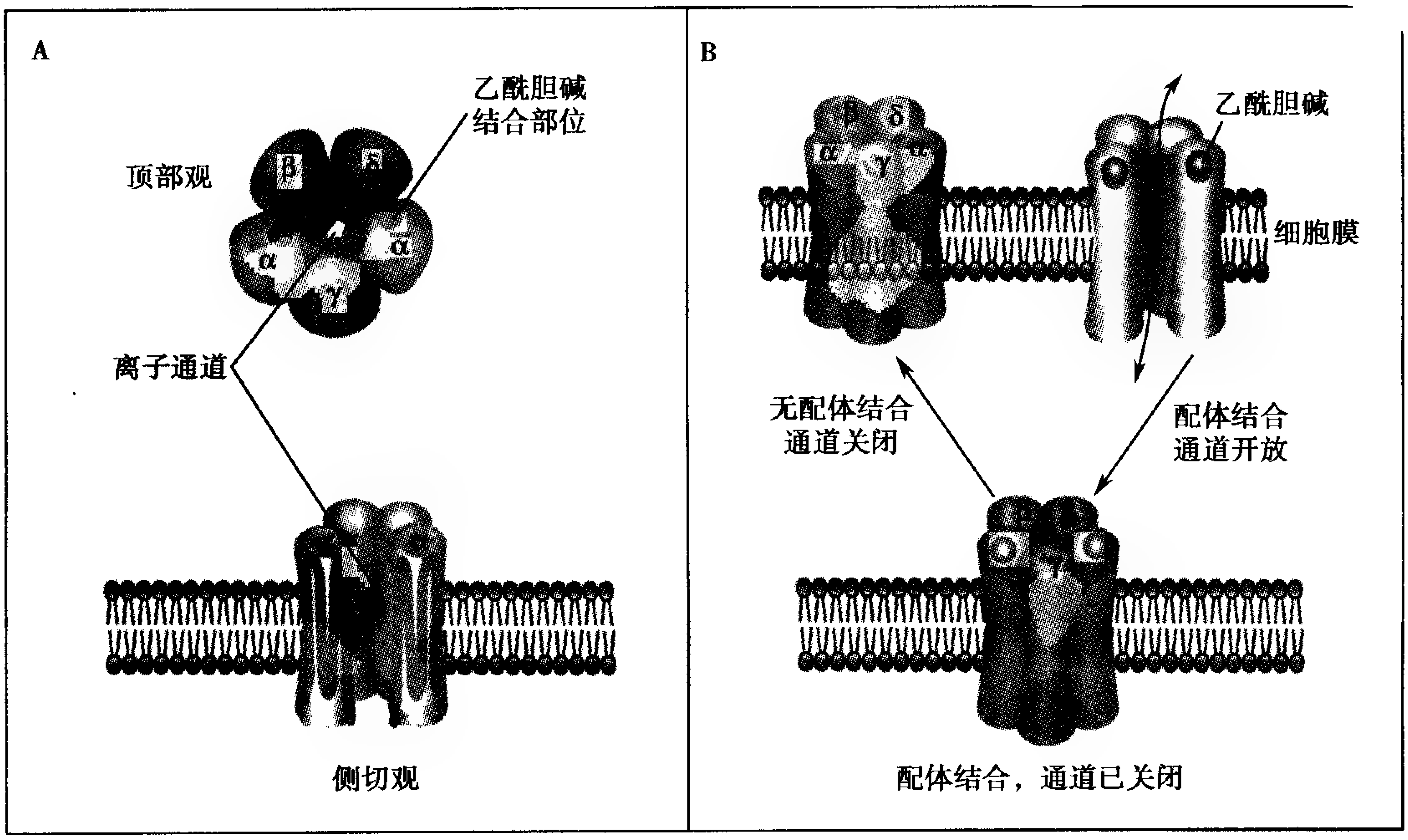
离子通道型受体主要在神经冲动的快速传递中发挥作用。这种离子通道与受电位控制的离子通道不同，它们的开放或关闭直接受化学配体的控制，称为配体门控受体型离子通道（ligand-gated receptor channel），其配体主要为神经递质。

此类受体以三种构象存在（图15-11）。两分子乙酰胆碱的结合可以使之处于通道开放构象，但即使有乙酰胆碱的结合，该受体处于通道开放构象状态的时限仍十分短暂，在几十毫微秒内又回到关闭状态。然后乙酰胆碱与之解离，受体恢复到初始状态，做好重新接受配体的准备。

离子通道受体信号转导的最终效应是细胞膜电位改变，可以认为，离子通道受体是通过将化学信号转变成为电信号而影响细胞功能的。离子通道型受体可以是阳离子通道，如乙酰胆碱、谷氨酸和五羟色胺的受体，也可以是阴离子通道，如甘氨酸和γ-氨基丁酸的受体。阳离子通道和阴离子通道的差异是由于构成亲水性通道的氨基酸组成不同，因而通道表面携带有不同电荷所致。

三、七跨膜受体依赖G蛋白转导信号

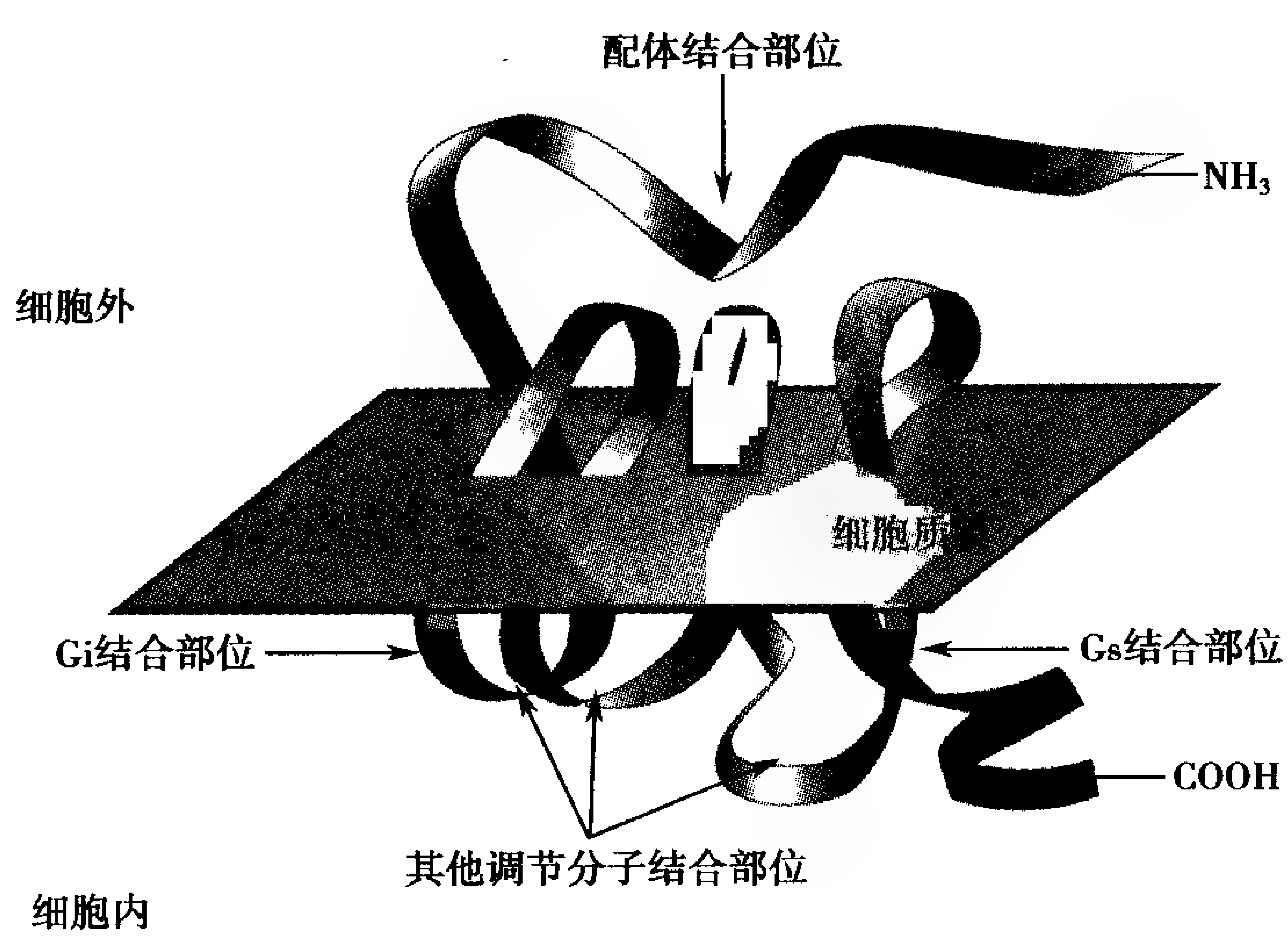
七跨膜受体（serpentine receptor）又被称为G蛋白偶联型受体（G protein coupled receptor，GPCR），这是由于这一类受体的细胞内部分总是与前已述及的异源三聚体G蛋白相结合，而且受体信号转导的第一步反应都是活化G蛋白。这一类受体接收包括多种神经递质、肽类激素、趋化因子等化学信号，在味觉、视觉和嗅觉等生理过程中接受外源理



●图 15-11　乙酰胆碱受体的结构与功能模式图

化因素的受体亦属 GPCR。对人类基因组的初步分析表明，编码的 GPCR 的基因应该在 1000 种以上。

GRCP 是由一条肽链组成的糖蛋白，氨基端位于细胞外表面，羧基端在胞膜内侧，完整的肽链中有 7 个跨膜区段（图 15-12），由于肽链反复跨膜，在膜外侧和膜内侧形成了几个环状结构，分别负责结合配体、传递细胞内信号等等。胞内的第 2 和第 3 个环状结构能与 G 蛋白相结合。



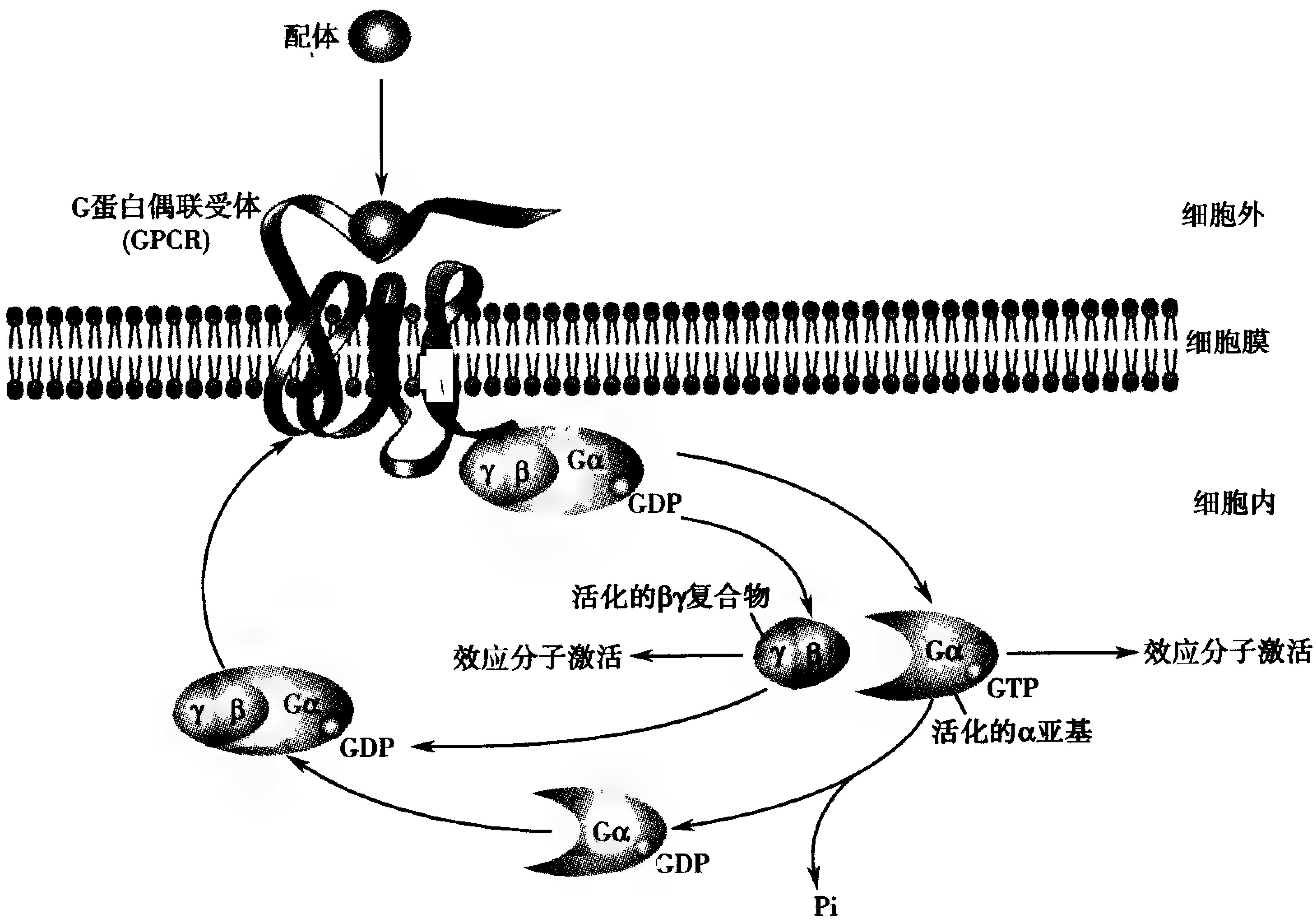
●图 15-12　G 蛋白偶联（七跨膜）受体的结构

GPCR 介导的信号转导可通过不同的通路产生不同的效应，但信号转导的基本模式大致相同，主要过程包括：①配体与受体结合；②受体活化 G 蛋白；③G 蛋白激活或抑制下游效应分子（effectors）；④效应分子改变细胞内第二信使的含量与分布；⑤第二信使作用

于相应的靶分子，使之构象改变，从而改变细胞的代谢过程及基因表达等功能。

(一) G蛋白的活化启动信号转导

G蛋白的激活过程如图15-13所示。配体与受体的结合改变受体构象，再引起G蛋白构象改变，α亚基与GDP的亲和力下降，释放GDP，与GTP结合，与βγ亚基解离，成为活化状态的α亚基。α亚基再激活细胞内的各种效应分子将信号进一步传递；α亚基具有内在GTP酶活性，将GTP水解成GDP，α亚基重新与βγ亚基结合形成三聚体，回到静止状态。G蛋白这种有活性和无活性状态的转换称为G蛋白循环。



●图15-13　G蛋白循环

(二) G蛋白偶联受体通过G蛋白-第二信使-靶分子发挥作用

活化的G蛋白的α亚基主要作用于生成或水解细胞内第二信使的酶，如AC、PLC等效应分子，改变它们的活性，从而改变细胞内第二信使的浓度。可以激活AC的G蛋白α亚基称为α_s(s代表stimulate)；反之称为α_i(i代表inhibit)。偶联于受体的G蛋白有数十种之多，部分G蛋白的α亚基种类、其作用的效应分子及所调节的细胞内信使见表15-7。

表15-7　哺乳动物细胞中的G-亚基种类及效应

G蛋白种类	效应	产生的第二信使	第二信使的靶分子
s	AC活化↑	cAMP↑	PKA活性↑
i	AC活化↓	cAMP↓	PKA活性↓
q	PLC活化↑	Ca^{2+}、IP_3、DAG↑	PKC活化↑
t	cGMP-PDE活性↑	cGMP↓	Na^+通道关闭

由于G蛋白存在多样性，形成了细胞内如AC-cAMP-PKA、PLC-IP_3/DG-PKC、PDE-cGMP-Na^+通道、PLC-IP_3-Ca^{2+}/CaM-PK通路等等不同的GPCR信号通路。限于篇

幅，这里分别以胰高血糖素和血管紧张素Ⅱ受体为例，介绍两种该类受体信号转导的基本方式。

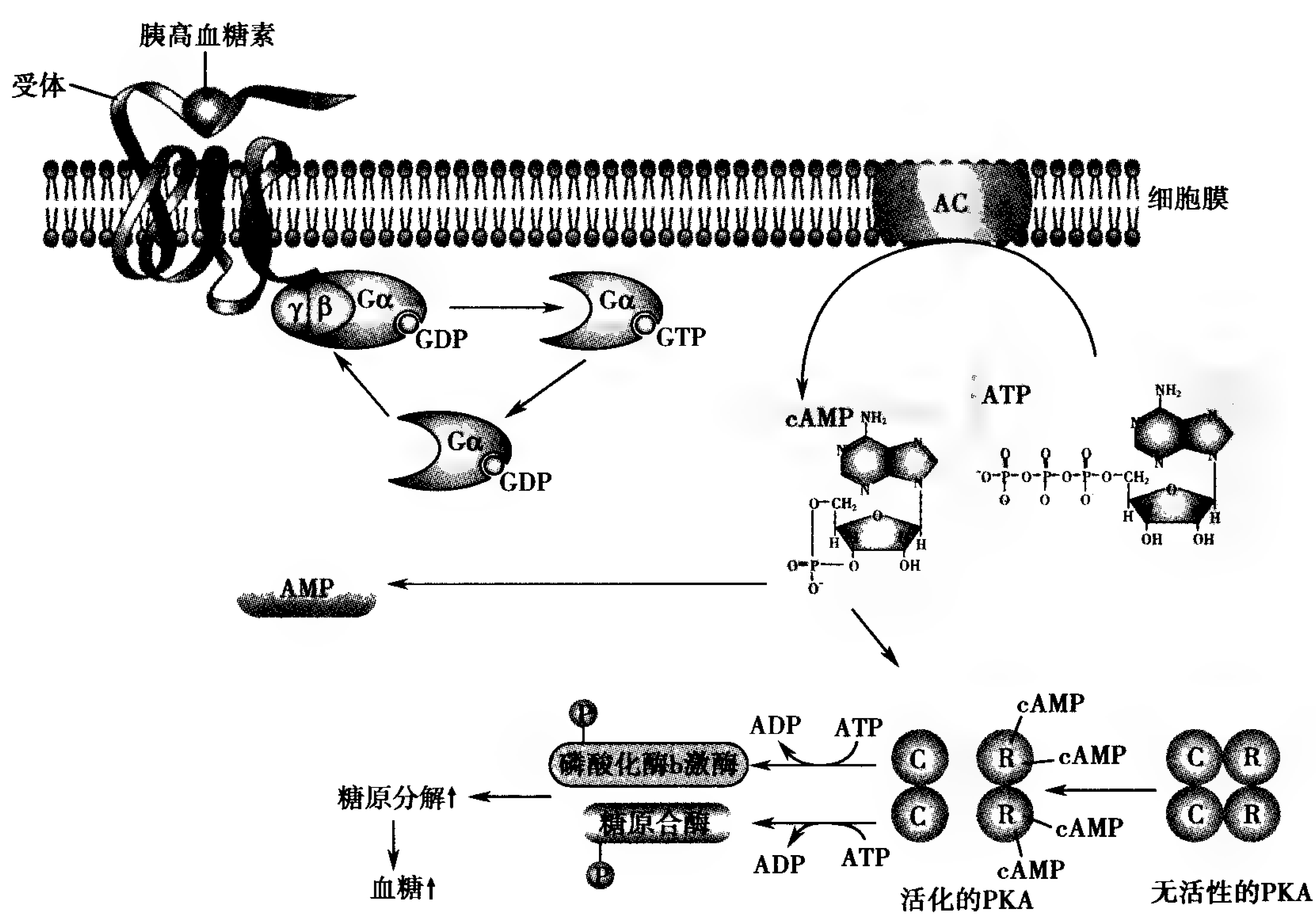
七跨膜受体关键信号转导分子——G蛋白的发现

自发现第二信使 cAMP 后，腺苷酸环化酶（AC）活化的详细机制成为当时最引人入胜的生物化学研究领域。M. Rodbell 在 1969 年首先证明了 AC 本身不是外源信号的受体，接着发现 GTP 为 AC 活化所必需。1971 年，A. G. Gilman 分离到一细胞株，该株细胞含有正常的肾上腺素受体和 AC，但是却不能在肾上腺素作用下发生 cAMP 的升高。经细胞膜成分重组，他们发现一种新的 GTP 结合蛋白质为此信号转导所必需，并最终纯化了该蛋白质，进而证明了 G 蛋白是受体与 AC 间的信号中介分子，由此开辟了认识细胞内近千种 G 蛋白偶联受体信号转导机制的先河。A. G. Gilman 和 M. Rodbell 分享了 1994 年诺贝尔生理医学奖。

（三）胰高血糖素受体通过 AC-cAMP-PKA 通路转导信号

胰高血糖素（glucagon）受体偶联的 G 蛋白为 Gs，通过 AC-cAMP-PKA 通路发挥效应。该通路以靶细胞内 cAMP 浓度改变和激活 PKA 为主要特征，是激素调节物质代谢的主要途径。

图 15-14 示意了胰高血糖素受体结合胰高血糖素信号以后，通过 G 蛋白激活 AC，直至出现糖原分解代谢增加应答的基本信号转导过程。体内许多信号利用 AC-cAMP-PKA 通路转导信号，表 15-8 列举了其中一部分。



●图 15-14 胰高血糖素受体通过 AC-cAMP-PKA 途径介导信号转导

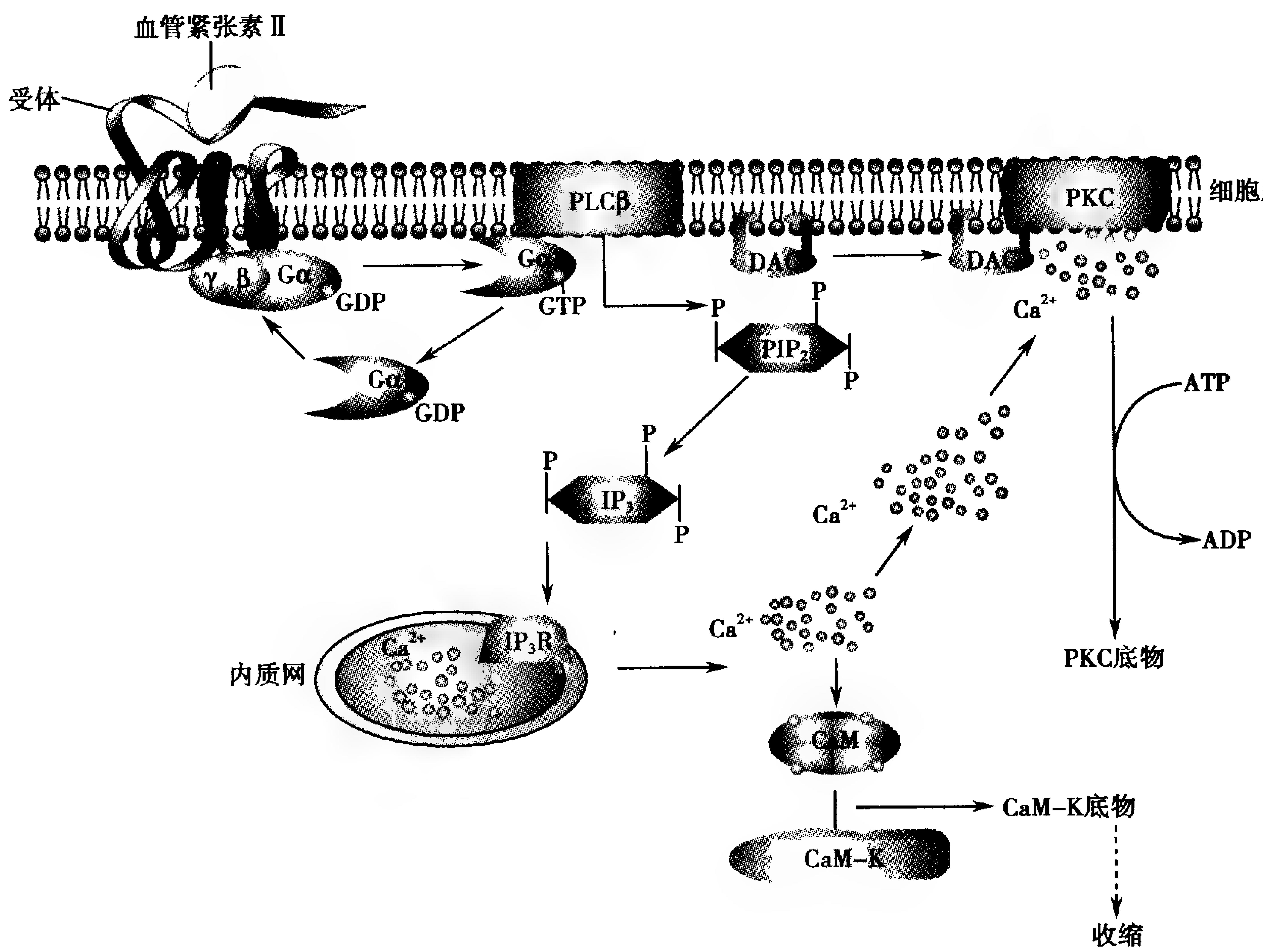
表 15-8　利用 AC-cAMP-PKA 转导信号的部分化学信号

促肾上腺皮质激素	组织胺（H_2 受体）	前列腺素 E1，E2
促肾上腺皮质激素释放激素	促黄体激素	5-HT（1a）、5-HT（2）
多巴胺	促黑素（MSH）	生长激素抑制系
肾上腺素	嗅觉分子	味觉分子
胰高血糖素	甲状旁腺素	

正常细胞内 cAMP 的平均浓度为 10^{-6}mol/L。cAMP 在细胞中的浓度除与 AC 活性有关外，还与 PDE 活性有关。例如茶碱类药物可以抑制磷酸二酯酶，促使细胞内 cAMP 浓度升高。

（四）血管紧张素Ⅱ受体通过 PLC-IP_3/DAG-PKC 通路介导信号转导

血管紧张素Ⅱ（angiotensin Ⅱ）受体亦属于 G 蛋白偶联受体，但是偶联的 G 蛋白属于 Gq，通过 PLC-IP_3/DAG-PKC 通路发挥效应。图 15-15 示意了血管紧张素Ⅱ受体接受配体信号，直至出现血管收缩应答的基本信号转导过程。表 15-9 则列举了其他一些利用 PLC-IP_3/DAG-PKC 通路的化学信号。



●图 15-15　血管紧张素Ⅱ受体通过 PLC-IP_3/DAG-PKC 途径介导信号转导

表 15-9　利用 PLC-IP_3/DG-PKC 转导信号的部分化学信号

乙酰胆碱	光（果蝇）	5-羟色胺
ATP	促胃泌激素释放肽	促甲状腺激素释放激素
肾上腺能激动剂	谷氨酸	后叶加压素-抗利尿激素
血管肾张素Ⅱ	促性腺激素释放激素	组胺［H_1 受体］

四、单跨膜受体依赖酶的催化作用传递信号

单跨膜受体大多为糖蛋白，仅含有一个跨膜区段，其信号转导的共同特征是需要直接依赖酶的催化作用作为信号传递的第一步反应，故又称为酶偶联受体。这些受体或自身具有酶活性，或者自身没有酶活性，但与酶分子结合存在。单跨膜受体主要接受生长因子和细胞因子的信号，调节细胞内蛋白质的功能和表达水平、调节细胞增殖和分化。酶偶联受体种类繁多，自 1981 年发现第一个具有蛋白酪氨酸激酶（PTK）活性的生长因子受体以来，陆续发现多种具有 PTK 活性的受体，后来又发现了一些具有其他催化活性的受体（表 15-10），但是仍然以具有 PTK 活性和与 PTK 偶联的受体居多。

表 15-10　具有各种催化活性的受体

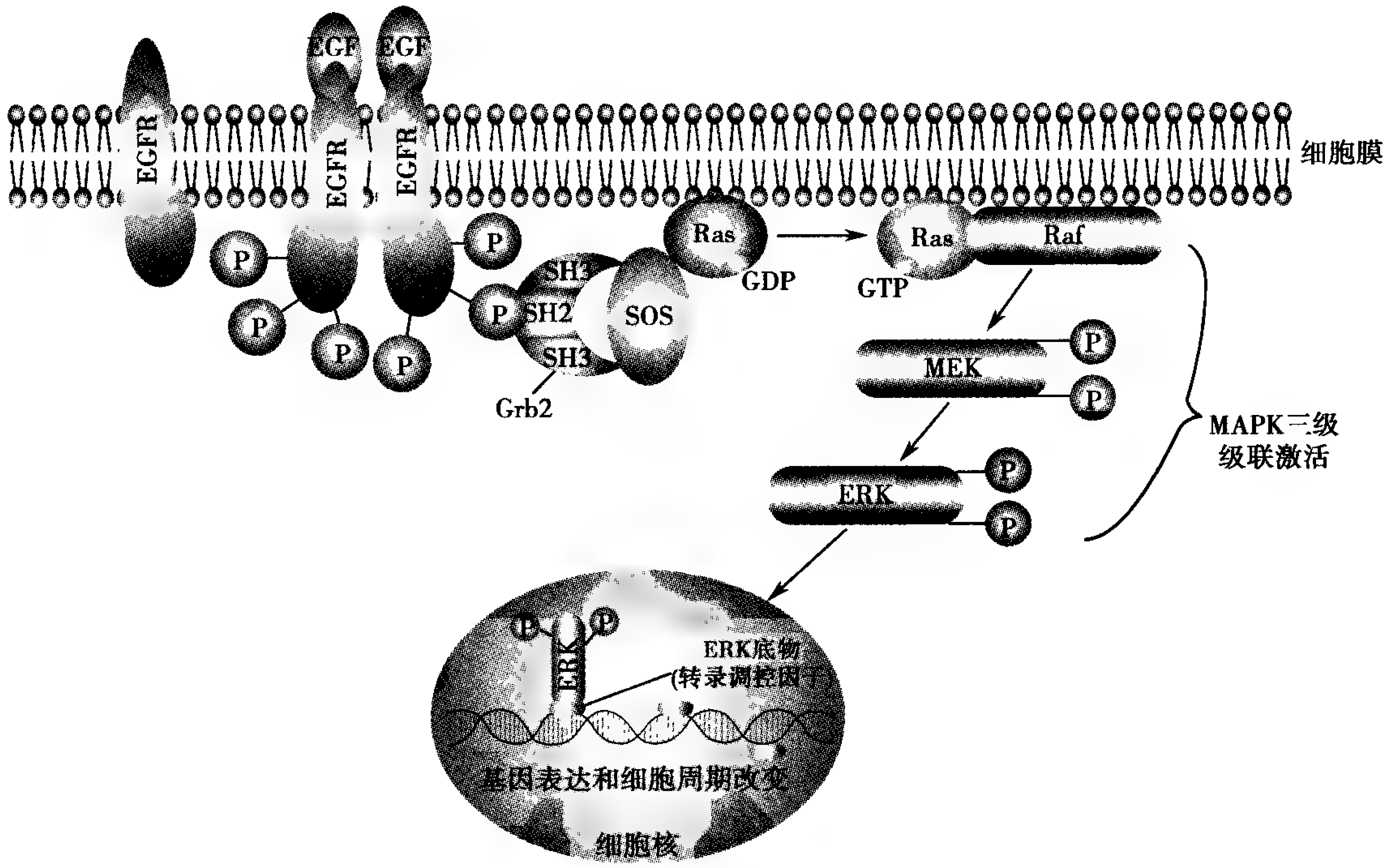
英 文 名	中 文 名	举　例
receptors tyrosine kinase（RTK）	受体型蛋白酪氨酸激酶	表皮生长因子受体、胰岛素受体等
tyrosine kinase-coupled receptor（TKCR）	蛋白酪氨酸激酶偶联受体	干扰素受体、白细胞介素受体、T 细胞抗原受体等
receptors tyrosine phosphatase（RTP）	受体型蛋白酪氨酸磷酸酶	CD45
receptors serine/threonine kinase（RSTK）	受体型蛋白丝/苏氨酸激酶	转化生长因子 β 受体、骨形成蛋白受体等
receptors guanylate cyclase（RGC）	受体型鸟苷酸环化酶	心钠素受体等

单跨膜受体所介导的信号传递与转换过程与 G 蛋白偶联型受体介导的信号转导有着很大差别。单跨膜受体介导的信号转导过程主要通过蛋白质分子的相互作用而介导，这些蛋白质分子通过可逆的磷酸化或 GTP 结合开关控制信号通路。不同种类的单跨膜受体所介导的信号转导通路既有差别，亦有许多共同通路，这里仅举几个典型例子。

（一）Ras-MAPK 途径是 EGFR 的主要信号通路

表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）是一种多肽，具有促进创伤后表皮愈合等作用。EGF 受体（EGFR）是一典型受体型 PTK，分子质量约 170kD。该受体的信号转导过程如图 15-16 所示：①受体形成二聚体，改变构象，PTK 活性增强，胞内区数个酪氨酸残基在激酶作用下发生自我磷酸化（autophosphorylation）；②酪氨酸磷酸化的 EGFR 产生了可被 SH2 结构域所识别和结合的位点，含有 1 个 SH2 结构域和 2 个 SH3 结构域生长因子结合蛋白（growth factor binding protein，Grb2）作为衔接分子结合到酪氨酸磷酸化的受体上；③Grb2 通过募集 SOS 而激活 Ras。SOS 是低分子量 G 蛋白的正调节因子，含有可以被 Grb2 的 SH3 识别和结合的模体结构。SOS 结合到 Grb2 后被活化，作用于低分子量 G 蛋白开关 Ras，促进 Ras 蛋白的 GDP 释放和 GTP 结合；④活化的 Ras 引起 MAPK 级联活化。活化的 Ras 作用于其下游分子 Raf，使之活化。Raf 是 MAPK 磷酸化级联反应的第一个分子（属于 MAPKKK），作用于 MEK（属于 MAPKK），磷酸化的 MEK 再作用于 ERK1（属于 MAPK），至此完成了 MAPK 的三级磷酸化及激活过程；⑤转录因子磷酸化。活化的 ERK 转位至细胞核。一些转录调控因子是 ERK 的底物，在其作用下发生磷酸化，进而影响靶基因表达水平，调节细胞生长和分化状态。

上述 Ras→MAPK 途径是 EGFR 的主要信号通路之一。此外，许多单跨膜受体也可以激活这一信号通路，甚至 G 蛋白偶联受体也可以通过一些调节分子作用在这一通路。由于 EGFR 的胞内段存在着多个酪氨酸磷酸化位点，因此除 Grb2 外，还可募集其他含有



●图 15-16 EGFR 介导的信号转导过程

SH2 结构域信号转导分子，形成 PLC-IP_3/DAG-PKC 通路、PI 3K 等其他信号通路。

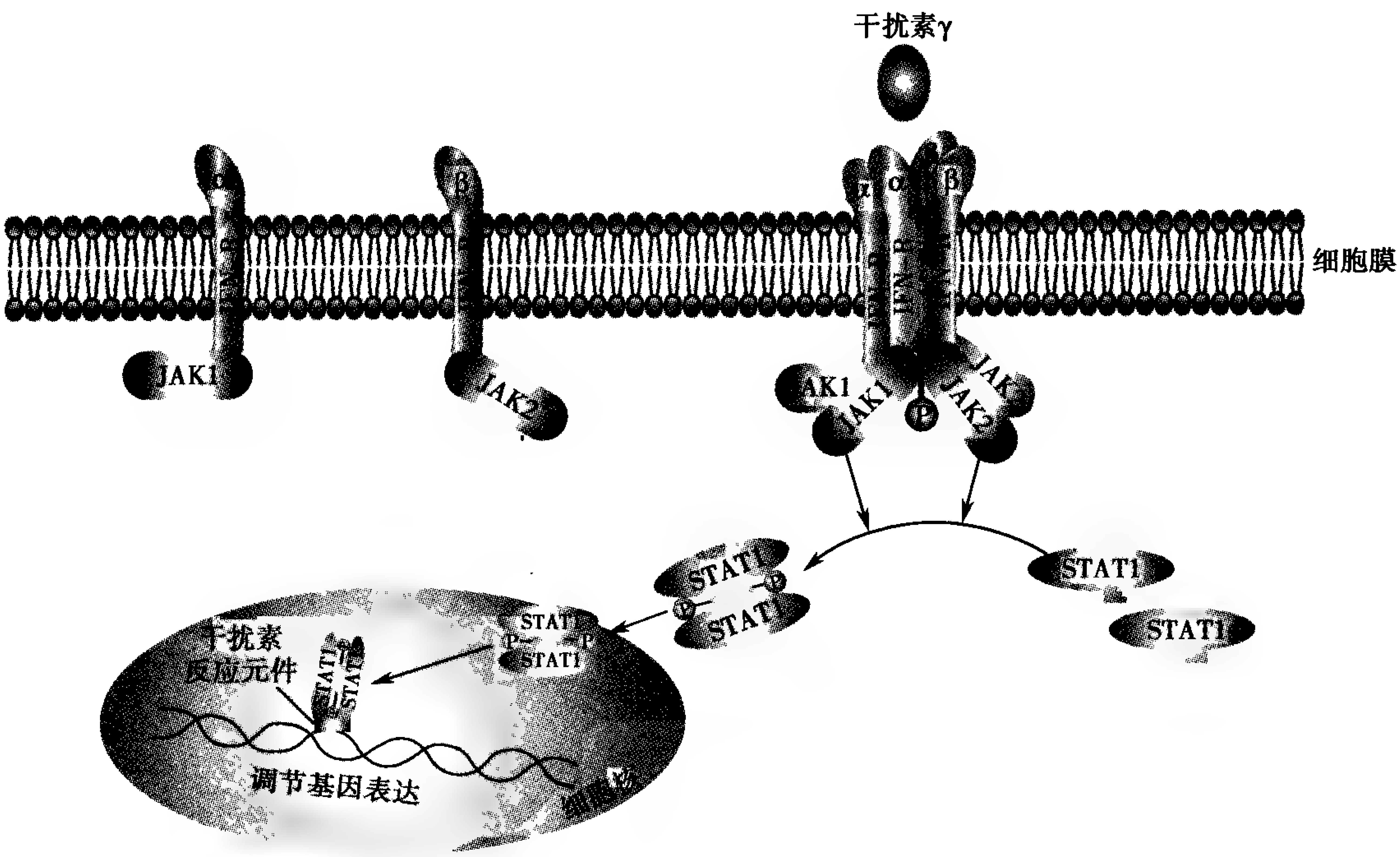
（二）JAK-STAT 通路转导白细胞介素受体信号

大部分与免疫细胞活化密切相关的白细胞介素受体属于酶偶联受体，但自身不具备酶活性。干扰素、白细胞介素 2、白细胞介素 3 等细胞因子的受体通过与之相结合的蛋白酪氨酸激酶 JAK（Janus kinase）和下游的转录因子 STAT（signal transducer and activator of transcription），即 JAK-STAT 通路转导信号（图 15-17）。JAK 为非受体型蛋白酪氨酸激酶，与细胞因子受体结合存在，活化后作用在 STAT 分子使之发生酪氨酸磷酸化。磷酸化的 STAT 分子形成二聚体进入胞核，作为转录因子影响相关基因的表达，改变靶细胞的增殖与分化。细胞内有数种 JAK 和数种 STAT 的亚型存在，激活后的受体可与不同的 JAKs 和不同的 STAT 相结合，分别转导不同的白细胞介素的信号。

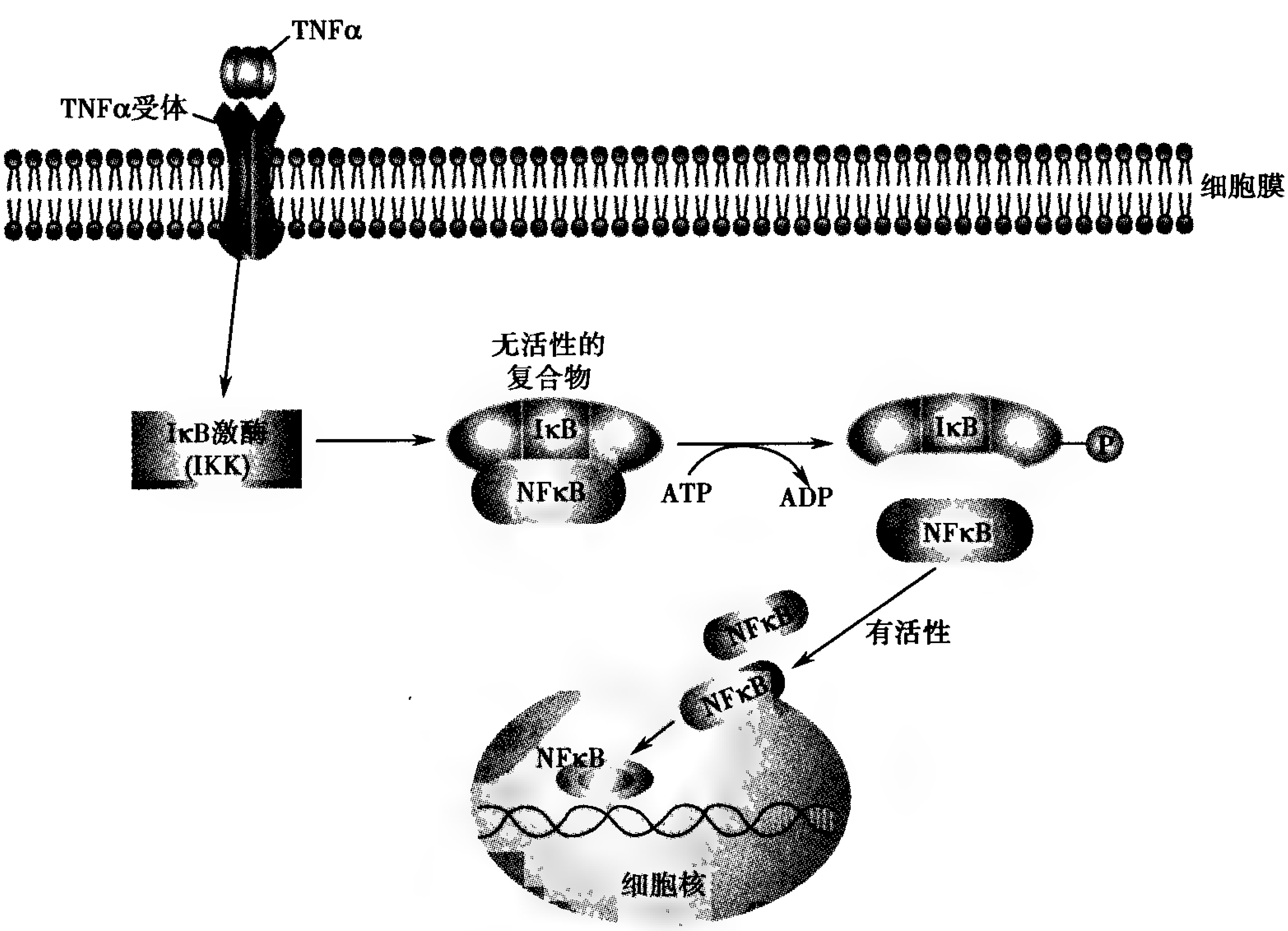
（三）NF-κB 是重要的炎症和应激反应信号分子

肿瘤坏死因子受体（TNF-R）、白介素 1 受体等重要的促炎细胞因子受体家族所介导的主要信号转导通路之一是 NF-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）通路（图 15-18）。NF-κB 最初作为 B 淋巴细胞中免疫球蛋白 κ 轻链基因转录所需的核内转录因子被发现，后来证明 NF-κB 是一种几乎存在于所有细胞的转录因子，广泛参与机体防御反应、组织损伤和应激、细胞分化和凋亡以及肿瘤生长抑制等过程。

NF-κB 是由 p50 和 p65 两个亚单位以不同形式组合形成的同源或异源二聚体，在体内发挥生理功能的主要是 p50-p65 二聚体。NF-κB 结构内包括 DNA 结合区、蛋白质二聚化区和核定位信号。静止状态下，NF-κB 在细胞质内与 NF-κB 抑制蛋白（inhibitor of NF-κB，IκB）结合成无活性的复合物。当 TNFα 作用于相应受体后，通过 IκB 的磷酸化（由 IκB 激酶 IKK 催化）使其从 NF-κB 脱落，NF-κB 得以活化。活化的 NF-κB 转位进入细胞核，作用于 NF-κB 结合增强子元件，影响多种细胞因子、黏附因子、免疫受体、急性时相蛋白和应激反应蛋白基因的转录。



●图 15-17　JAK-STAT 通路转导信号

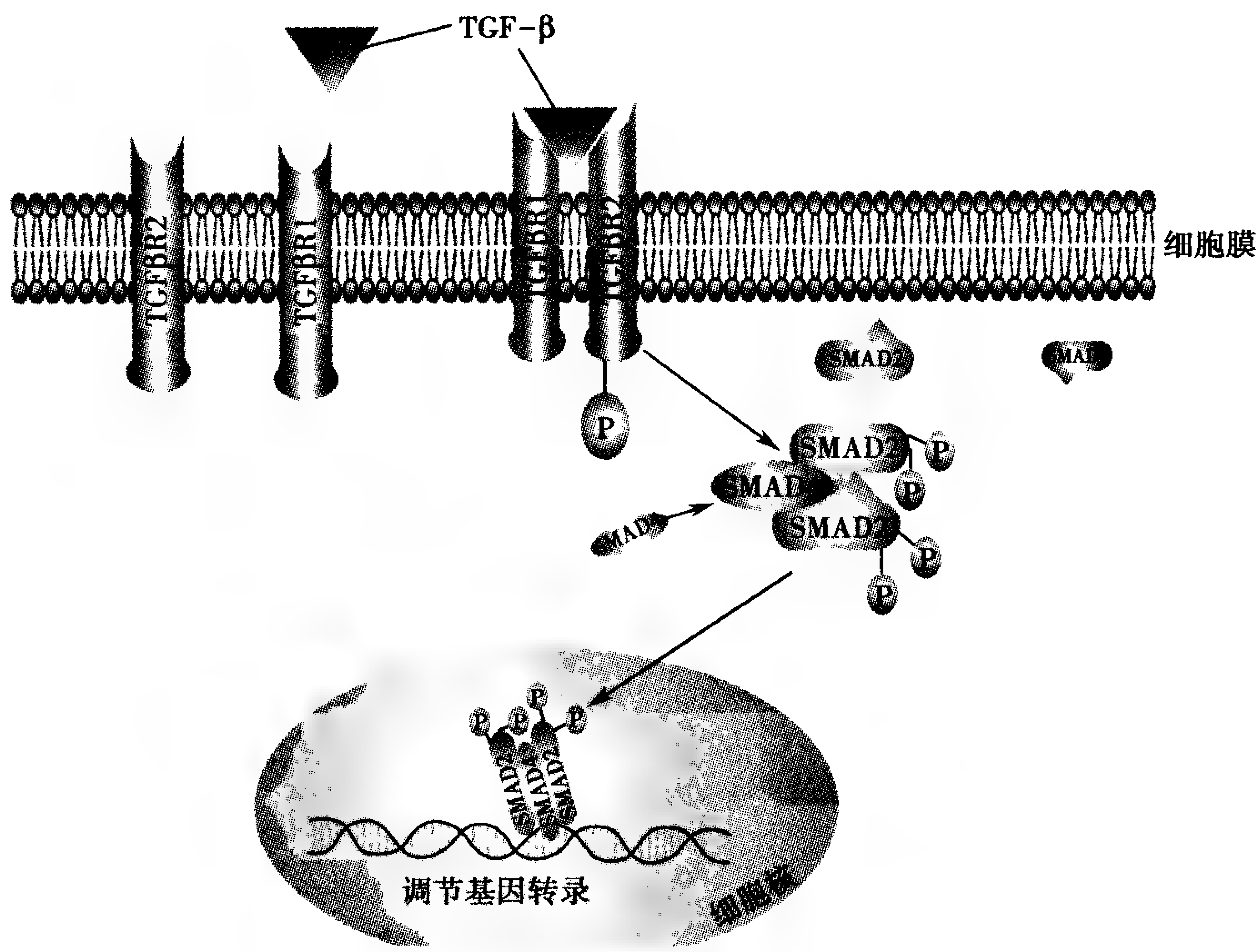


●图 15-18　NF-κB 信号转导通路

（四）TGF-β 受体是蛋白丝氨酸激酶

转化生长因子-β（transforming growth factor β，TGF-β）参与调节增殖、分化、迁移和凋亡等多种细胞反应。TGF-β 受体的特征是自身具有蛋白丝氨酸激酶催化结构域。当

TGF-β与受体结合时，受体得以活化。活化的受体催化一类重要的转录因子Smad发生丝氨酸磷酸化，磷酸化的Smad分子形成同源寡聚体或异源寡聚体后进入细胞核（图15-19），调节相应基因的转录速度，最后影响细胞分化。



●图15-19 TGF-β受体介导的信号转导通路

Smad家族是最早被证实的TGF-β受体激酶的底物。Smad的名称取自于果蝇的*Mother against dpp*（*Mad*）和线虫的（*Sma*）基因。细胞内至少有9种Smad分子存在，各自负责TGF-β家族不同成员的信号转导。

五、细胞信号转导过程的特点和规律

上述各种受体介导的信号转导过程充分体现了细胞对外源信号反应的复杂性和多样性。复杂的信号转导途径和网络的运行存在一些共同的规律和特点：①对于外源信息的反应信号的发生和终止十分迅速，即可以迅速满足功能调整的需要，已经产生的信号又需要及时终止以便细胞恢复常态；②信号转导过程是多级酶反应，因而具有级联放大效应，以保证细胞反应的敏感性；③细胞信号转导系统具有一定的通用性，一些信号转导分子和信号转导通路常常为不同的受体共用，而不是每一个受体都有自己完全专用的分子和途径，使得细胞内有限的信号转导分子即可以满足多种受体信号转导的需求；④不同信号转导通路之间存在广泛的信息交流（cross talk）。

影响细胞可以对外源信息做出特异性反应的因素包括：细胞间信息分子的浓度、相应受体的分布与含量、细胞内信号转导分子的种类和含量等。不同组织可以以不同的方式使用同一信号转导分子，但是相互作用的分子可以不同，蛋白激酶的底物也可能不一样，从而导致输出信号的差别。由于信号转导网络的极端复杂性，与人类基因组研究类似，系统化和规模化研究将是阐明细胞信号转导机制的必然趋势。

第四节 细胞信号转导与医学

在人类基因组计划完成以后，信号转导机制研究作为后基因组研究的重要内容将继续成为生命科学的研究热点。如前所述，阐明细胞信号转导机制对于认识生命活动的本质具有重要的理论意义，同时也为医学的发展带来了新的机遇和挑战。信号转导机制研究在医学发展中的意义主要体现在两个方面，一是对发病机制的深入认识，二是为新的诊断和治疗技术提供靶位。目前，人们在这一方面的认识还相对有限，本节仅列举一些具体实例说明这一领域发展的重要性。

信号转导分子的异常可以发生在编码基因，也可以发生蛋白质合成直至其细胞内降解的全部过程的各个层次和各个阶段。从受体接受信号直至最后细胞功能的读出信号发生的异常都可以导致疾病的发生。

一、信号转导分子的结构改变是许多疾病发生发展的基础

已经证实的与GPCR信号通路密切相关的G蛋白基因突变可以导致一些遗传性疾病，如色盲、色素性视网膜炎、家族性ACTH抗性综合征、侏儒症、先天性甲状旁腺功能低下、先天性甲状腺功能低下或功能亢进等。

遗传性假性甲状旁腺素低下的基因突变

假性甲状旁腺素低下症患者血中有正常甲状旁腺素水平，却表现为功能低下。1989年，Patten等从一个假性甲状旁腺素低下症家系的先证者和其母亲的红细胞膜分离到一个异常的Gs蛋白。对病人的编码Gs基因（GANS1）进行序列分析后发现第一个外显子中的第一个编码甲硫氨酸并作为起始码的ATG突变为GTG。这一突变使得Gs的翻译合成不能正常起始，而是利用第二个ATG（第60位氨基酸），产生的是N端缺失了59个氨基酸残基的异常Gs。这是第一个人类G蛋白突变的报告。该发现证明了假性甲状旁腺素低下症是由于G蛋白的信号转导功能丧失，因而对甲状旁腺素无反应所致。

许多其他疾病亦与GPCR通路有关。心力衰竭的重要生化特征之一是细胞内腺苷酸环化酶活性降低。慢性长期儿茶酚胺刺激可以导致β-肾上腺素能受体（β-AR）表达下降，并使之失去对肾上腺素的敏感。总体效应是cAMP水平下降，心肌收缩功能不足。最近人们还证实，人群中β_2-AR遗传多态性与个体心脏对运动的耐受力有关。例如β-ARs偶联的Gs的第四个跨膜区在一些人群中有一个苏氨酸被异亮氨酸替代，这类人群如发生心力衰竭，存活率明显低于其他人，且运动能力低下。这些发现将有助于发现心脏疾患的危险人群。

除G蛋白偶联型受体以外，还有多种遗传性疾病是由于影响了单跨膜受体及其介导的信号转导通路中的信号转导分子的结构所引起。一部分胰岛素抵抗的糖尿病是由于遗传性胰岛素受体异常所致；一部分遗传性免疫缺陷病是由于单跨膜受体介导的信号通路上的信号转导分子结构异常所致。例如，第一个被发现与人类遗传性疾病相关的细胞内蛋白酪氨酸激酶是Bruton’s综合征——人类X染色体连锁低γ球蛋白血症（X-linked agarmma-

globulinemia，XLA）的致病基因 *btk*。人的 JAK3 突变可以导致常染色体隐性遗传性联合性免疫缺陷病。

肿瘤的发生和发展涉及多种单跨膜受体信号通路的异常，许多癌基因或抑癌基因的编码产物都是该信号通路中的关键分子，尤其是各种蛋白酪氨酸激酶，更是与肿瘤发生密切相关。

一些细菌性感染性疾病的发病机制也在分子水平得到新的解释，即 G 蛋白在细菌毒素的作用下发生化学修饰而导致功能异常。这些疾病包括霍乱、破伤风等。大量实验资料证明证实霍乱的症状是肠上皮细胞内 cAMP 含量急剧升高所导致。霍乱毒素的 A 亚基进入小肠上皮细胞以后直接作用于 $G\alpha s$ 的 α 亚基，使其发生 ADP-核糖化修饰，导致其固有的 GTP 酶活性丧失，不能恢复到 GDP 结合形式，因而 $G\alpha s$ 处于持续活化状态，细胞中的 cAMP 含量持续升高。cAMP 的效应之一是通过 PKA 作用于小肠上皮细胞膜上的蛋白质磷酸化而改变细胞膜的通透性，Na^+ 通道和氯离子通道持续开放，造成水与电解质的大量丢失，引起腹泻和水电解质紊乱等症状。

除了霍乱以外，破伤风毒素和百日咳毒素也都是作用于 G 蛋白而导致受累细胞功能异常的。由于不同的毒素在细胞膜上的受体不同，故这些毒素作用于不同的细胞引起不同的症状。

二、细胞信号转导分子是重要的药物作用靶位

随着细胞信号转导机制研究的发展，尤其是对于各种疾病过程中的信号转导异常的不断认识，为发展新的疾病诊断和治疗手段提供了更多的机会。在研究各种病理过程中发现的信号转导分子结构与功能的改变为新药的筛选和开发提供了靶位，由此产生了信号转导药物这一概念。

信号转导分子的激动剂和抑制剂是信号转导药物的研究出发点，尤其是各种蛋白激酶的抑制剂更是被广泛用作母体药物进行抗肿瘤新药的研究。

一种信号转导干扰药物是否可以用于疾病的治疗而又具有较少的副作用，主要取决于两点。一是它所干扰的信号转导途径在体内是否广泛存在，如果该途径广泛存在于各种细胞内，其副作用则很难得以控制。二是药物自身的选择性，对信号转导分子的选择性越高，副作用就越小。基于上述两点，人们一方面正在努力筛选和改造已有的化合物，以发现具有更高选择性的信号转导分子的激动剂和抑制剂，同时也在努力了解信号转导分子在不同细胞的分布情况。这些努力已经使得一些药物得以用于临床，特别是在肿瘤治疗研究领域。

小 结

细胞信号转导是多细胞生物对环境应答引起生物学效应的重要过程。信息转导过程包括：特定的细胞释放信息物质→信息物质经扩散或血液循环到达靶细胞→与靶细胞的受体特异性结合→受体对信号进行转换并启动靶细胞信使系统→靶细胞产生生物学效应。目前已知的细胞间信息物质的化学本质有蛋白质和肽类、氨基酸及其衍生物、类固醇激素、脂酸衍生物和气体分子等。

细胞膜和细胞内存在细胞间化学信号的受体，分别接受脂溶性和水溶性化学信号。受体与配体结合具有高专一性、高亲和性、可饱和性及可逆性等特点。

细胞内众多分子参与信号转导。主要的细胞内生物化学变化是小分子第二信使的浓度

和分布的变化和蛋白质构象的变化。蛋白激酶和蛋白磷酸酶、GTP 结合蛋白是两大类最重要的信号转导通路开关分子。细胞信号转导通路的结构基础是蛋白质复合物，蛋白质相互作用的基础是 SH2、SH3 等蛋白质相互作用结构域，多种衔接蛋白和支架蛋白是构成蛋白质复合物的重要分子。

细胞膜受体介导的信息转导是本章讨论的重点内容。离子通道型膜受体是化学信号与电信号转换器，介导多种神经递质信号。七跨膜受体通过 G 蛋白的活化传递信号，故又称为 G 蛋白偶联受体。重要的 GPCR 信号通路有 AC-cAMP-PKA 和 PLC-IP_3/DG-PKC 等，第二信使的变化是 GPCR 信号通路的共同特征。单跨膜受体依赖于酶的催化作用传递信号，酶活性可以存在于受体本身，也可以存在于直接与受体结合的分子。PTK Grb2-Ras-MAPK 信号通路可以被多种生长因子受体活化；白细胞介素利用 JAK-STAT 通路影响基因表达；NF-κB 通路主要涉及机体的防御反应；TGF-β 受体具有蛋白丝/苏氨酸激酶活性，通过 Smad 磷酸化转导信号。

细胞内信号转导过程具有迅速产生并迅速终止、级联放大、复杂的交叉联系的特点，全面阐明这些错综复杂的调节网络是生命科学研究的重要任务。

信号转导机制研究在医学发展中的意义主要体现在两个方面：一是对发病机制的深入认识；二是为新的诊断和治疗技术提供靶位。

（药立波）

第十六章　血液的生物化学

血液（blood）在封闭的血管内循环，正常人体的血液总量约占体重的8%。血液由液态的血浆（plasma）与混悬在其中的红细胞、白细胞和血小板组成。血浆约占全血容积的55%～60%。血液凝固后析出淡黄色透明液体，称作血清（serum）。凝血过程中，血浆中的纤维蛋白原转变成纤维蛋白析出，故血清中无纤维蛋白原。

正常人血液的含水量约为77%～81%，比重为1.050～1.060，它主要取决于血液内的血细胞数和蛋白质的浓度。血液的pH为7.40±0.05，渗透压在37℃时约为7.70×102kPa(310mOsm/L)。

血液的固体成分可分为无机物和有机物两大类。无机物主要以电解质为主，重要的阳离子有Na^+、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}，重要的阴离子有Cl^-、HCO_3^-、HPO_4^{2-}等，它们在维持血浆晶体渗透压、酸碱平衡以及神经肌肉的正常兴奋性等方面起重要作用。有机物包括蛋白质、非蛋白质类含氮化合物、糖类和脂类等。非蛋白质类含氮化合物主要有尿素、肌酸、肌酸酐、尿酸、胆红素和氨等，它们中的氮总称为非蛋白氮（non protein nitrogen，NPN）。正常人血中NPN含量为14.28～24.99mmol/L。其中血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）约占NPN的1/2。

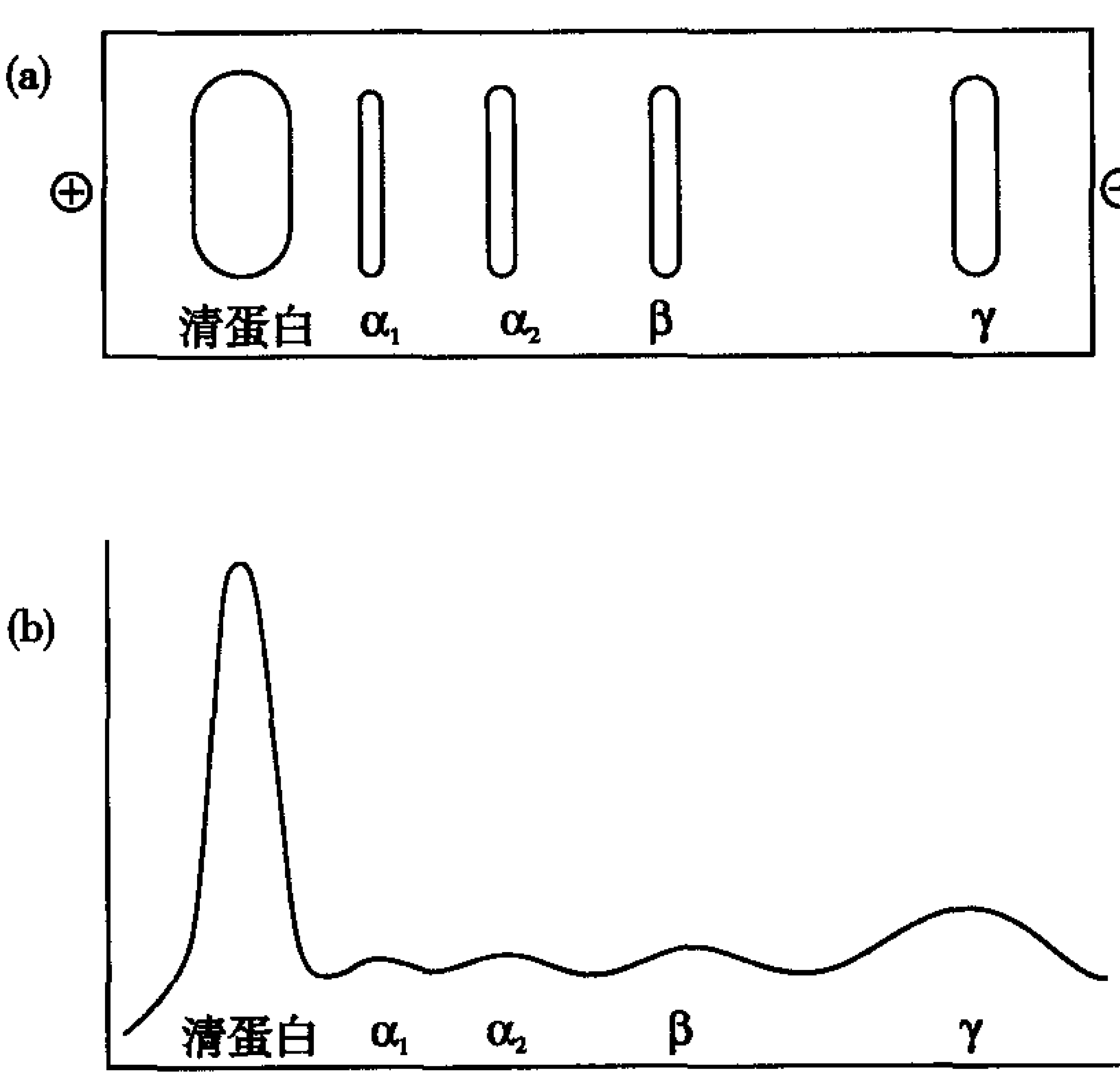
本章将从生物化学角度阐述以下三个问题：①血浆蛋白；②血液凝固；③血细胞代谢。

第一节　血浆蛋白是维持体内代谢的重要物质

一、血浆蛋白质的分类与性质

（一）血浆蛋白质的分类

人血浆内蛋白质总浓度大约为70～75g/L，它们是血浆主要的固体成分。血浆蛋白质种类很多，目前已知血浆蛋白质有200多种，其中既有单纯蛋白质又有结合蛋白，如糖蛋白和脂蛋白，血浆中还有几千种抗体。血浆内各种蛋白质的含量极不相同，多者每升达数十克，少的仅为毫克水平。



● 图16-1　血清蛋白的醋酸纤维素膜电泳图谱
（a）染色后的图谱；（b）光密度扫描后的电泳峰

通常按来源、分离方法和生理功能将血浆蛋白质分类。分离蛋白质的常用方法包括电泳（electrophoresis）和超速离心（ultra centrifuge）。

电泳是最常用的分离蛋白质的方法。由于电泳的支持物不同，其分离程度差别很大。临床常采用简单快速的醋酸纤维素薄膜电泳，以pH 8.6的巴比妥溶液作缓冲液，可将血清蛋白质分成五条区带：清蛋白（albumin）、α_1球蛋白（globulin）、α_2球蛋白、β球蛋白和γ球蛋白（图16-1）。清蛋白是人体血浆中最主要的蛋白质，浓度达38～48g/L，约占血浆总蛋白的50%。肝每天约合成12克清蛋白。清蛋白以前清蛋白的形式合成，成熟的清蛋白是一含585个氨基酸残基的单一多肽链，分子形状呈椭圆形。球蛋白的浓度为15～30g/L。正常的清蛋白与球蛋白的比例（A/G）为

1.5～2.5。用聚丙烯酰胺凝胶电泳等可将血清蛋白质分成数十条区带。

超速离心是根据蛋白质的密度将其分离，如血浆脂蛋白的分离。

由于有些蛋白质的结构和功能尚不清楚，所以难以对全部血浆蛋白做出十分恰当的分类。按醋酸纤维素膜电泳可血浆蛋白分类如表16-1。

表16-1　血浆蛋白的种类、生成部位、主要功能和正常含量

血浆蛋白种类	生成部位	主要功能	正常含量（克/100毫升血浆）
白蛋白	肝	维持血浆渗透	3.8～4.8
α球蛋白　α_1球蛋白 α_2球蛋白	主要在肝	压、运输、营养运输	1.5～3.0
β球蛋白	大部分在肝	运输	
γ球蛋白	主要在肝外	免疫	
纤维蛋白原	肝	凝血	0.2～0.4

血浆蛋白质多种多样，各种血浆蛋白有其独特的功能，除按分离方法分类外。目前亦采用功能分类法。可分为以下8类：①凝血系统蛋白质，包括12种凝血因子（除Ca^{2+}外）；②纤溶系统蛋白质，包括纤溶酶原、纤溶酶、激活剂及抑制剂等；③补体系统蛋白质；④免疫球蛋白；⑤脂蛋白；⑥血浆蛋白酶抑制剂，包括酶原激活抑制剂、血液凝固抑制剂、纤溶酶抑制剂、激肽释放抑制剂、内源性蛋白酶及其他蛋白酶抑制剂；⑦载体蛋白；⑧未知功能的血浆蛋白质。

（二）血浆蛋白质的性质

尽管血浆蛋白的种类繁多，但由于血浆蛋白容易获得，而且许多血浆蛋白基因已被克隆，故得到了许多有关它们的结构、功能、合成和周转的信息，对它们已有较深入的了解，现将血浆蛋白的性质归纳如下：

1. 绝大多数血浆蛋白质在肝合成，如清蛋白、纤维蛋白原和纤维粘连蛋白等。还有少量的蛋白质是由其他组织细胞合成的，如γ球蛋白是由浆细胞合成的。

2. 血浆蛋白的合成场所一般位于膜结合的多核糖体（polyribosome）上。在进入血浆前，它们在肝细胞内经历了从粗面内质网到高尔基复合体再抵达质膜而分泌入血液的途径。即合成的蛋白质转移入内质网池，然后被酶切去信号肽，前蛋白变成成熟蛋白。血浆蛋白自肝细胞内合成部位到血浆的时间为30分钟至数小时不等。

3. 除清蛋白外，几乎所有的血浆蛋白质均为糖蛋白，它们含有N—或O—连接的寡糖链。一般认为寡糖链包含了许多生物信息，发挥重要的作用。血浆蛋白合成后须定向转移，此过程需要寡糖链。寡糖链中包含的生物信息可起识别作用，如红细胞的血型物质含糖达80%～90%，ABO系统中血型物质A、B均是在血型物质O的糖链非还原端各加上N-乙酰氨基半乳糖（GalNAc）或半乳糖（Gal）。正是一个糖基的差别，使红细胞能识别不同的抗体。再如用唾液酸酶（neuraminidase）切除寡糖链末端唾液酸残基，常可使一些血浆蛋白的半衰期缩短。

4. 许多血浆蛋白呈现多态性。多态性是孟德尔式或单基因遗传的性状。在人群中，如果某一蛋白质具有多态性说明它至少有两种表型，每一种表型的发生率不少于1%～2%。ABO血型是广为人知的多态性，另外α_1抗胰蛋白酶、结合珠蛋白、运铁蛋白、铜蓝蛋白和免疫球蛋白等均具多态性。研究血浆蛋白的多态性对遗传学、人类学和临床医学均有重要意义。

5. 在循环过程中，每种血浆蛋白均有自己特异的半衰期。正常成人的清蛋白和结合

珠蛋白的半衰期分别为20天和5天左右。

6. 在急性炎症或某种类型组织损伤等情况下，某些血浆蛋白的水平会增高，它们被称为急性时相蛋白质（acute phase protein，APP）。增高的蛋白包括C-反应蛋白（CRP，由于同肺炎球菌的C多糖起反应而得名）、α_1抗胰蛋白酶、结合珠蛋白、α_1酸性蛋白和纤维蛋白原等。这些蛋白质水平的增高，少则增加50%，最多可增至1000倍。患慢性炎症或肿瘤时，也会出现这种升高，提示急性时相蛋白质在人体炎症反应中起一定作用。例如，α_1抗胰蛋白酶能使急性炎症期释放的某些蛋白酶失效；白细胞介素1（IL-1）是单核吞噬细胞释放的一种多肽，它能刺激肝细胞合成许多急性时相反应物（acute phase reactant，APR）。急性时相期，亦有些蛋白质浓度出现降低，如清蛋白和转铁蛋白等。

二、血浆蛋白质的功能

血浆蛋白质种类繁多，虽然其中不少蛋白质的功能尚未完全阐明，但对血浆蛋白质的一些重要功能有较深入的了解，现概述如下。

(一) 维持血浆胶体渗透压

虽然血浆胶体渗透压仅占血浆总渗透压的极小部分（1/230），但它对水在血管内外的分布起决定性的作用。正常人血浆胶体渗透压的大小，取决于血浆蛋白质的摩尔浓度。由于清蛋白的分子量小（69kD），在血浆内的总含量大、摩尔浓度高，加之在生理pH条件下，其电负性高，能使水分子聚集其分子表面，故清蛋白能最有效地维持胶体渗透压。清蛋白所产生的胶体渗透压大约占血浆胶体总渗透压的75%～80%。当血浆蛋白浓度，尤其是清蛋白浓度过低时，血浆胶体渗透压下降，导致水分在组织间隙潴留，出现水肿。

(二) 维持血浆正常的pH

正常血浆的pH为7.40±0.05。蛋白质是两性电解质，血浆蛋白质的等电点大部分在pH 4.0～7.3之间，血浆蛋白盐与相应蛋白形成缓冲对，参与维持血浆正常的pH。

(三) 运输作用

血浆蛋白质分子的表面上分布有众多的亲脂性结合位点，脂溶性物质可与其结合而被运输。血浆蛋白还能与易被细胞摄取和易随尿液排除的一些小分子物质结合，防止它们从肾丢失。脂溶性维生素A以视黄醇形式存在于血浆中，它先与视黄醇结合蛋白形成复合物，再与前清蛋白以非共价键缔合成视黄醇-视黄醇结合蛋白-前清蛋白复合物。这种复合物一方面可防止视黄醇的氧化；另一方面防止小分子量的视黄醇-视黄醇结合蛋白复合物从肾丢失。血浆中的清蛋白能与脂肪酸、Ca^{2+}、胆红素、磺胺等多种物质结合。此外血浆中还有皮质激素传递蛋白、运铁蛋白、铜蓝蛋白等。这些载体蛋白除结合运输血浆中某种物质外，还具有调节被运输物质代谢的作用。

(四) 免疫作用

血浆中的免疫球蛋白，IgG、IgA、IgM、IgD和IgE，又称为抗体，在体液免疫中起至关重要的作用。此外，血浆中还有一组协助抗体完成免疫功能的蛋白酶——补体。免疫球蛋白能识别特异性抗原并与之结合，形成的抗原抗体复合物能激活补体系统，产生溶菌和溶细胞现象。

(五) 催化作用

血浆中的酶称作血清酶。根据血清酶的来源和功能，可分为以下三类：

1. 血浆功能酶 这类酶主要在血浆发挥催化功能，如凝血及纤溶系统的多种蛋白水解酶，它们都以酶原的形式存在于血浆内，在一定条件下被激活后发挥作用。此外血浆中

还有生理性抗凝物质、假胆碱酯酶、卵磷脂：胆固醇酰基转移酶、脂蛋白脂肪酶和肾素等。血浆功能酶绝大多数由肝合成后分泌入血，并在血浆中发挥催化作用。

2. 外分泌酶　外分泌腺分泌的酶类包括胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰淀粉酶、胰脂肪酶和唾液淀粉酶等。在生理条件下这些酶少量逸入血浆，它们的催化活性与血浆的正常生理功能无直接的关系。但当这些脏器受损时，逸入血浆的酶量增加，血浆内相关酶的活性增高，在临床上有诊断价值。

3. 细胞酶　细胞酶存在于细胞和组织内，参与物质代谢的酶类。随着细胞的不断更新，这些酶可释放至血。正常时它们在血浆中含量甚微。这类酶大部分无器官特异性；小部分来源于特定的组织，表现为器官特异性。当特定的器官有病变时，血浆内相应的酶活性增高，可用于临床酶学检验。

（六）营养作用

每个成人 3 升左右的血浆中约有 200g 蛋白质。体内的某些细胞，如单核-吞噬细胞系统，吞饮血浆蛋白质，然后由细胞内的酶类将吞入细胞的蛋白质分解为氨基酸参入氨基酸池，用于组织蛋白质的合成，或转变成其他含氮化合物。此外，蛋白质还能分解供能。

（七）凝血、抗凝血和纤溶作用

血浆中存在众多的凝血因子、抗溶血及纤溶物质，它们在血液中相互作用、相互制约，保持循环血流通畅。但当血管损伤、血液流出血管时，即发生血液凝固，以防止血液的大量流失。

（八）血浆蛋白质异常与临床疾病

血浆蛋白质在维持人体正常代谢中有重要功能，血浆蛋白质异常可见于多种临床疾病，如风湿病、肝疾病和多发性骨髓瘤等。

1. 风湿病　血浆蛋白的异常改变主要包括急性炎症反应和由于抗原刺激引起的免疫系统增强的反应。其特征为：①免疫球蛋白升高，特别是 IgA，并可有 IgG 及 IgM 的升高；②炎症活动期可有 α_1AG、Hp、C3 成分升高。

2. 肝疾病　急性肝炎时，出现非典型的急性时相反应，特别 PA 是肝功能损害的敏感指标。血浆蛋白的异常改变主要包括急性炎症反应和由于抗原刺激引起的免疫系统增强的反应。其特征为：①免疫球蛋白升高，特别是 IgA，并可有 IgG 及 IgM 的升高；②炎症活动期可有 α_1 AG、Hp、C3 成分升高。

肝硬化时特征：IgG 增高、IgA 明显升高；C-反应蛋白、CER 及纤维蛋白原轻度升高；α_1 AG、Hp、C3 偏低；PA、Alb、α_1 脂蛋白及 TRF 明显降低；α_2MG 则可出现明显增高。

3. 多发性骨髓瘤　多发性骨髓瘤是由浆细胞恶性增生所致的一种肿瘤。

总的蛋白电泳图谱表现为：①在原 r 区带外出现一特征性的 M 蛋白峰；②白蛋白区带下降。

第二节　血液凝固是凝血与抗凝血因子的动态调节

血管内皮损伤、血液流出血管时，血液内发生一系列酶促级联反应，使血液由液体状态转为凝胶状态，它是止血过程的重要组成部分。止血过程可分四个阶段：①受损血管收缩，以减少和减慢受损部位的血流；②在血管受损部位，血管内皮细胞产生 von Willebrand 因子（vWF），它是一种大分子糖蛋白。因能与血小板糖蛋白 Ib 和内皮下胶原结合，使其成为血小板黏附在内皮下的桥梁。黏附的血小板被皮下组织或局部形成的凝血酶所激活，就发生释放反应和花生四烯酸代谢，释放反应分泌释放的 ADP 和花生四烯酸衍生的

血栓烷（TX）A_2 均可引起血小板聚集，与纤维蛋白原聚集成团，形成白色血栓；③水溶性纤维蛋白原转变成纤维蛋白，并聚合成网状，血细胞黏附其上，形成牢固的红色血栓；④纤溶酶部分或完全水解血栓。

正常血液中存在凝血因子、抗凝血因子和纤溶系统，它们共同作用，既可防止血液流失，又能保持血液在血管内的正常流动。

一、凝血因子与抗凝血成分

（一）凝血因子

参与血液凝固的因子统称凝血因子，已知血浆和组织中的凝血因子主要有 14 种。国际凝血因子命名委员会按其发现先后顺序用罗马字统一命名。现已命名到XIII。其中因子IV是钙离子，因子VI已知是血清中活化的凝血因子V，不再视为独立的凝血因子。还有两个因子发现较晚尚未用罗马字命名。现将凝血因子及其部分特点列于表 16-2。除因子IV外，其余均为糖蛋白，而且大部分由肝合成。

因子III是唯一不存在于正常人血浆中的凝血因子，它分布于各种不同的组织细胞中，又称组织因子(tissue factor，TF)。TF 的氨基末端伸展在细胞外，起到因子VII受体的作用。

因子II、VII、IX和X是依赖维生素 K 的凝血因子。以维生素 K 为辅酶的维生素依赖

表 16-2　凝血因子的某些特征

凝血因子	同义名	合成场所	分子量	氨基酸残基数	亚基数目	含糖量%	血浆浓度(mg%)	衍生物	功能
I	纤维蛋白原(fibrinogen)	肝	340000(人,牛)	2964	3×2	3～4	200～400	纤维蛋白	形成凝胶
II	凝血酶原(prothrombin)	肝	68700(人) 72000(牛)	579	1	8.2(人) 10～14(牛)	10～15	凝血酶	蛋白酶
III	组织凝血活素(tissue thrombo-plastin)	各组织细胞	33000 220000(牛)	263					辅因子
IV	钙离子(calciumion)								辅因子
V	前加速素(proaccelerin)	肝	290000～400000	2196	多[illegible]	11～18	5～10	IV(Va)	辅因子
VII	血清凝血活酶转变加速素(convertin)又称 SPCA	肝	63000(人)	406	1	9.1	0.4～0.7	VIIa	蛋白酶
VIII	抗血友病球蛋白(antihemophilic globulin 简写 AHG)	肝为主	1100000(人,牛)	2332	?	6(人) 9(牛)	15～20	VIIIa	辅因子
IX	血浆凝血活素成分(plasma thrombo-plastin component 简写 PTC)又名抗乙种血友病因子	肝	55400(人,牛)	415	1	26	3～5	IXa	蛋白酶
X	Stuart-Prower 因子	肝	55000(人,牛)	448	1	10	5～10	Xa	蛋白酶

续表

凝血因子	同义名	合成场所	分子量	氨基酸残基数	亚基数目	含糖量%	血浆浓度(mg%)	衍生物	功能
XI	血浆凝血活素前质(plasma thromboplastin antecedent 简写 PTA)又名抗丙种血友病因子	肝?网状内皮系统?	160000(人,牛)	1214	2	12	0.5~0.9	XIa	蛋白酶
XII	接因子(hageman 因子)	网状内皮系统?	9000(牛)82000(人)	596	3	15	0.1~0.5	XIIa	蛋白酶
XIII	纤维蛋白稳定因子(fibrin stabilizing factor 简写 FSK)	血水板?肝?	320000(血浆)146000~165000(血小板)	274	5(血浆)	1~2	XIIIa	形成桥键	
	前激肽释放酶(prekallidrein)	肝	80000	619	1	10	1~2	激肽释放酶	蛋白酶
	高分子量激肽原(high molecular weight kininogen, HMWK)		110000~15000	626	1	?	7	缓激肽	辅因子

性 γ-羧化酶催化这些凝血因子中的某些谷氨酸残基羧化。γ-羧基谷氨酸有较大的电负性，能与 Ca^{2+} 形成盐键。Ca^{2+} 在凝血过程中起“搭桥”作用，它一侧与凝血因子带负电荷的 γ-羧基谷氨酸连接，另一侧与带负电的磷脂连接，形成的多酶复合物是凝血反应的基础。

因子XII、XI、激肽释放酶原和高分子激肽原等参与接触活化。当血浆暴露在带负电荷物质表面时，这些凝血因子在其表面发生一系列水解反应，除去一些小肽段而转变成活化的XIIa、XIa、激肽释放酶和高分子激肽，启动血液凝固。其他的凝血因子激活的过程也与此相似，故凝血过程是一系列酶促级联反应，具放大作用。

凝血因子Ⅰ、Ⅴ、Ⅷ和XIII是对凝血酶敏感的因子，凝血因子Ⅰ——纤维蛋白原是凝血酶的底物。因子Ⅴa 是因子Ⅹa 的辅因子，加速Ⅹa 因子对凝血酶原的激活。因子Ⅷa 是因子Ⅸa 的辅助因子参与Ⅸa 对因子Ⅹ的激活。XIIIa 是一种转谷氨酰胺酶，能使可溶性纤维蛋白变成不溶性的纤维蛋白多聚体，从而稳固纤维蛋白凝块。

维生素 K 的发现

丹麦哥本哈根大学生物化学研究所 H. Dam 在研究雏鸡的新陈代谢时发现，当给雏鸡喂食含极低脂肪的食物后，鸡的躯体不同部位出现出血症状，化验发现凝血延迟现象。经反复研究，Dam 于 1934 年发现，如果给鸡饲料中加入大麻籽，雏鸡的出血现象便消失。他认为大麻籽中含有某种能防止出血的未知物质。他将这种物质称为凝血维生素或维生素 K。随后，美国化学家 E. A. Doisy 完成了维生素 K 的制备、化学性质测定、合成与生产。维生素 K 是一种由萘醌类化合物组成的能促进血液凝固的脂溶性维生素，是肝合成凝血酶原（因子Ⅱ）的必需物质，还参与凝血因子Ⅶ，Ⅸ，Ⅹ以及蛋白 C 和蛋白 S 的合成。由于他们两人分别对维生素 K 的理论和实践做出了重大的贡献，两人分享了 1943 年诺贝尔生理医学奖。

（二）抗凝血成分

在生理情况下，也可能发生血管内皮损伤、血小板活化和少量凝血因子激活，从而发生血管内凝血，影响血流的畅通。但机体内也存在抗凝成分和纤溶系统，与凝血系统处于动态平衡。体内有三个主要的抗凝成分：抗凝血酶-Ⅲ（AT-Ⅲ）、蛋白C系统和组织因子途径抑制物。

1. 抗凝血酶-Ⅲ　AT-Ⅲ是血浆中最重要的生理性抗凝物质，它是一种 α_2 球蛋白。主要由肝合成，但肺、脾、心、肠、脑、血管内皮细胞和巨核细胞都能合成AT Ⅲ。AT-Ⅲ除能持久地灭活凝血酶外，还能抑制凝血因子Ⅹa、Ⅸa、Ⅺa、Ⅻa、纤溶酶、胰蛋白酶和激肽释放酶，引起抗凝。

2. 蛋白C系统　蛋白C系统包括蛋白C（PC）、蛋白S（PS）和蛋白C抑制物。PC由肝合成，是一种依赖维生素K的糖蛋白。凝血酶、胰蛋白酶和高浓度因子Ⅴa均可激活PC。激活的PC（APC）通过蛋白水解作用可使Ⅴa和Ⅷa灭活，此过程需要磷脂和 Ca^{2+} 参与。APC灭活Ⅴa后，阻碍了Ⅹa与血小板结合，大大降低Ⅹa的凝血活性。APC还能促进纤维蛋白溶解。

PS是由肝合成的依赖维生素K的蛋白质，它能作为APC的辅因子加速APC对Ⅴa的灭活，Ⅴa灭活后即丧失结合Ⅹa的能力，从而中断了血液凝固级联反应。蛋白C抑制物能与PC结合形成复合物而灭活APC。

3. 组织因子途径抑制物（TFPI）　TFPI是一种单链糖蛋白。凝血因子Ⅲ能与因子Ⅶ（或Ⅶa）形成复合物，并使此复合物中的Ⅶ能更有效地被血液中痕量的Ⅹa激活，从而激活外源性凝血途径。TFPI能直接抑制活化的Ⅹ因子而抑制凝血。

二、内、外源性凝血途径共同介导凝血中纤维蛋白的生成

凝血因子Ⅹ被激活成Ⅹa是使凝血酶原（thrombogen）活化的关键步骤。激活因子Ⅹ有两条途径：

（一）内源性途径

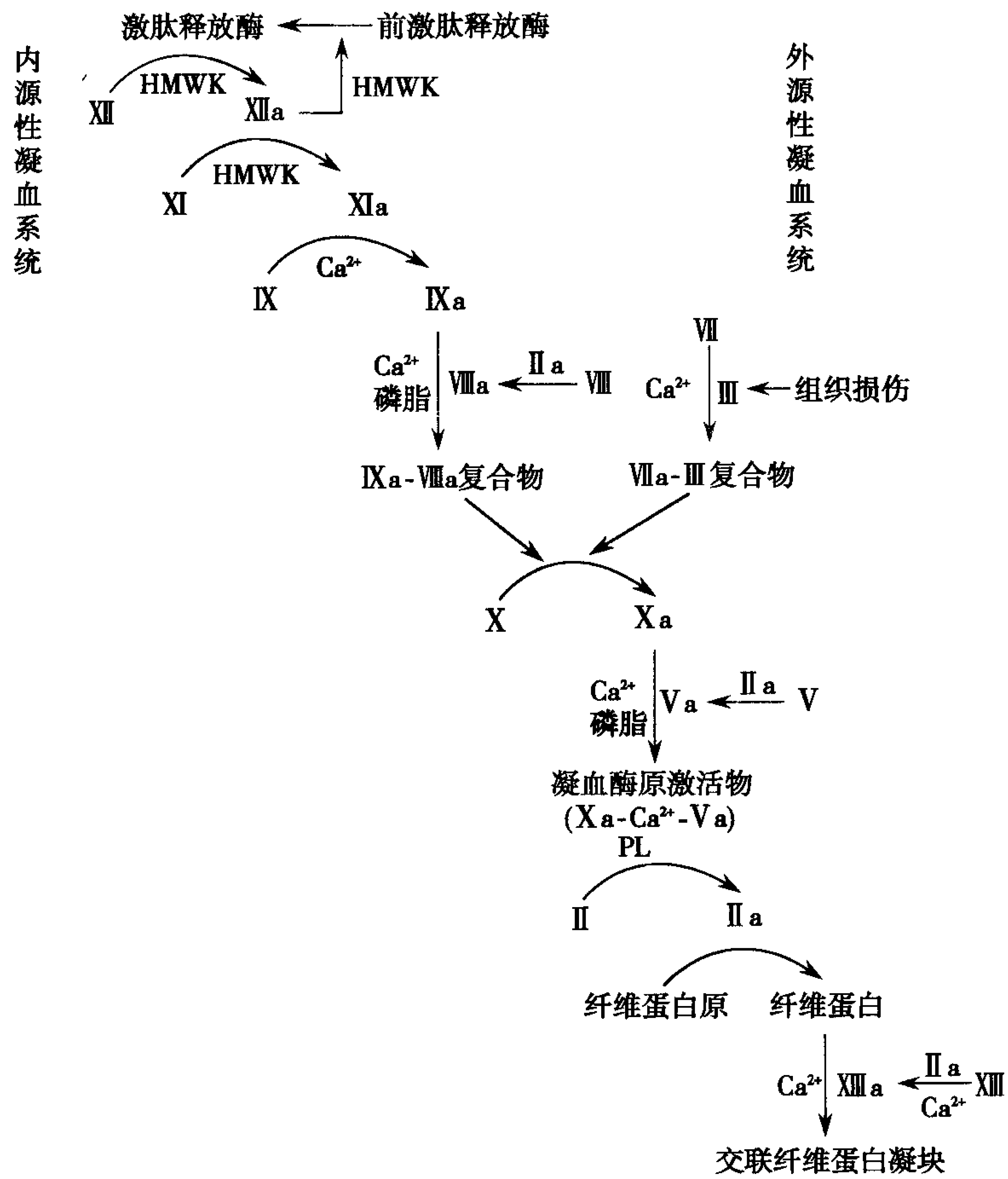
内源性途径是指血液在血管内膜受损或在血管外与异物表面接触时触发的凝血过程。该凝血过程可人为地分为三个阶段：①接触活化阶段，在此阶段因子Ⅻ和Ⅺ得以活化；②因子Ⅸ的激活；③因子Ⅹ的激活。

（二）外源性途径

外源性途径是指组织因子（因子Ⅲ）暴露于血液而启动的凝血过程。在正常情况下，组织因子并不与血液接触，但在血管损伤或血管内皮细胞及单核细胞受到细菌内毒素、补体 C_{5a}、免疫复合物、白介素-1和肿瘤坏死因子等因子刺激时，组织因子得以与血液接触并形成Ⅶ 组织因子复合物。因子Ⅶ -旦和组织因子结合就能被血液中痕量的Ⅹa激活而成为Ⅶa-组织因子复合物，能快速激活因子Ⅹ。

无论内源性凝血途径还是外源性凝血途径，一旦形成Ⅹa，就进入共同的通路——凝血酶（thrombin）的生成和纤维蛋白（fibrin）的形成。整个凝血过程见图16-2。

Ⅸa的作用是激活因子Ⅹ转变成Ⅹa，但单独的Ⅸa转变因子Ⅹ的能力很低，它需与Ⅷa形成1∶1的复合物并在酸性磷脂表面（包括血小板，单核/巨噬细胞和血管内皮细胞表面），有 Ca^{2+} 存在的情况下，才能有效地激活因子Ⅹ。同样，Ⅹa在有 Ca^{2+} 存在的情况下，在血小板等磷脂膜的表面与Ⅴa因子形成1∶1的复合物——凝血酶原复合物，水解凝血酶原为凝血酶。



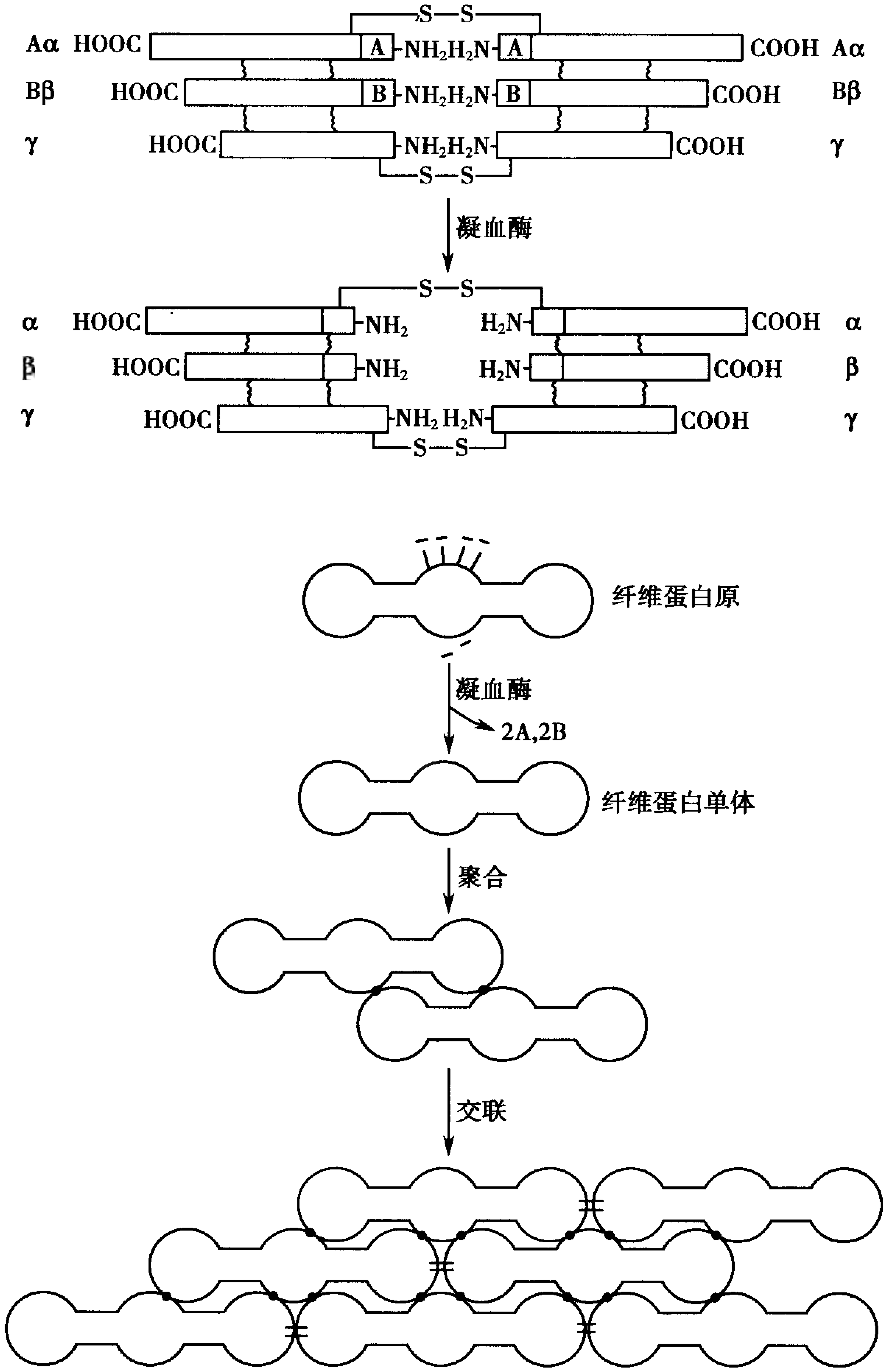
●图 16-2　内源性及外源性凝血系统的级联式酶促过程

血凝块的主要成分是纤维蛋白，它在损伤处形成一个网架，封住伤口。纤维蛋白在血浆中以纤维蛋白原（fibrinogen）形式存在。纤维蛋白原溶于水且不会聚合，凝血酶使它降解成为纤维蛋白并聚合成不溶于水的网状结构。

纤维蛋白原占血浆总蛋白的 2%～3%。纤维蛋白原分子由两条 α 链、两条 β 链和两条 γ 链组成，每三条肽链（α、β、γ 肽链）绞合成索状，形成两条索状肽链，两者的 N-端通过二硫键相连，整个分子成纤维状（图 16-3）。α 及 β 链的 N-端分别有一段 16 个和 14 个氨基酸残基组成的一段小肽，称为纤维肽 A 及 B。凝血酶原的作用就是切除这两段肽。失去纤维肽 A 及 B 后，纤维蛋白原就转变成纤维蛋白。此时，纤维蛋白间能横向黏合形成更大的纤维。但由于纤维蛋白分子有一定的弯度，所以达到一定的厚度也就不再增粗。为什么去除 A 和 B 肽后，纤维蛋白就能聚合？主要原因是暴露了黏合位点。其次 A 和 B 肽都带大量负电荷，电荷的排斥作用使纤维蛋白原不能聚合。

刚形成的纤维蛋白所产生的血块很不牢固，它很快在纤维蛋白稳定因子（ⅩⅢa）催化下交联。ⅩⅢa 是一个转酰胺酶，它催化 γ 肽链 C 端上的谷氨酰胺残基与邻近 γ 肽链上的赖氨酸残基的 ε 氨基共价结合（图 16-4）。α 链之间也同样发生交联。经过共价交联的纤维蛋白网就非常牢固。因子ⅩⅢ存在于血小板及血浆中，经凝血酶切除部分肽段后即被激活成ⅩⅢa。

血液凝固是机体防止出血的重要防御功能，但是必须适度。过度血凝可引起心肌梗死、脑血栓等严重疾病。但血浆内有多种凝血和抗凝物质，而且处于动态平衡，保证了血

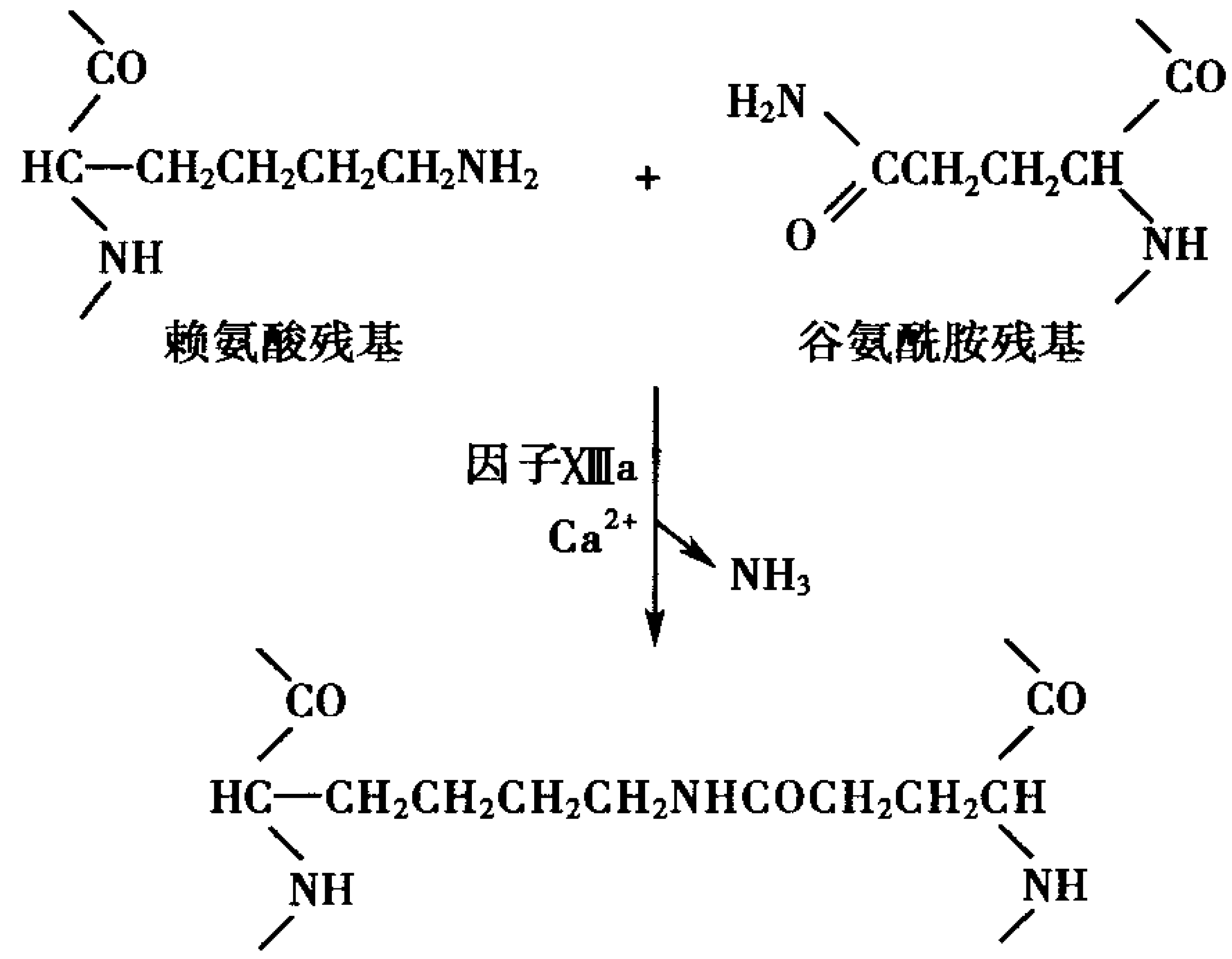


●图 16-3 纤维蛋白的生成及聚合

流的畅通。

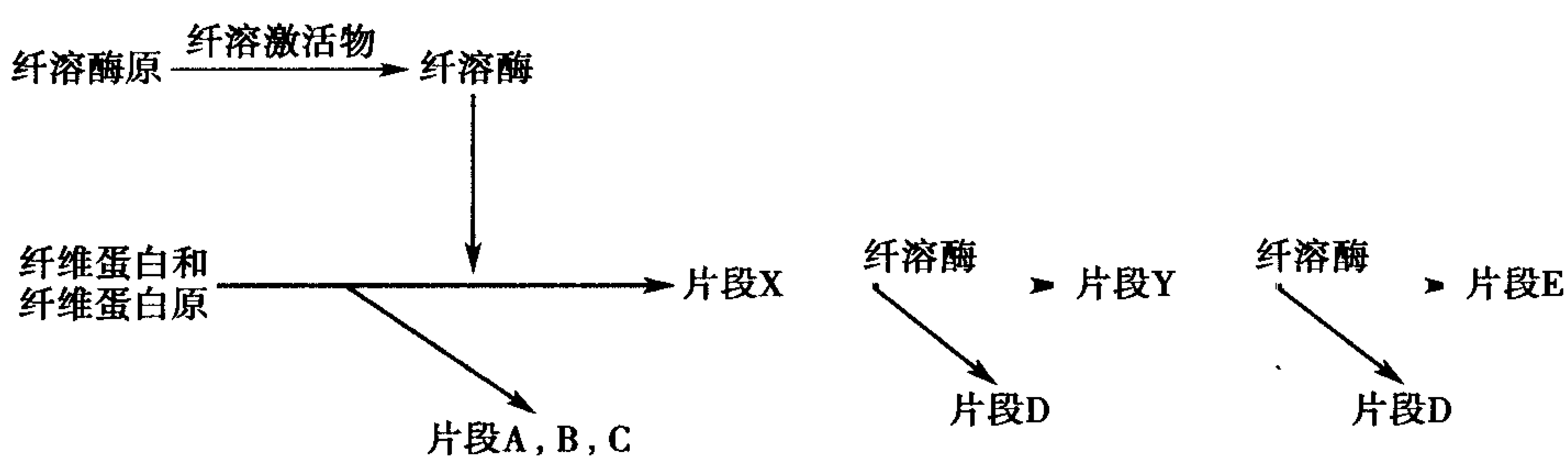
三、血凝块的溶解

血凝只是一种临时措施，伤愈后要被溶解和清除。一些不应发生凝血的场合，例如正常血液循环中发生了凝血或血块脱落有可能堵塞重要血管，此时纤维蛋白的溶解则刻不容缓。纤溶过程可分为血纤维蛋白溶酶原（plasminogen）激活和纤维蛋白溶解两个阶段。纤溶酶原可在内源性（因子Ⅻa、前激肽释放酶、因子Ⅺa 等）、外源性（血管、血液、组织激活剂）或外来的激活剂（尿激酶、链激酶）的作用下，转变为纤溶酶。后者特异地催化纤维蛋白或纤维蛋白原中由精氨酸或赖氨酸残基的羧基构成的肽键水解，产生一系列纤



●图 16-4　因子XIIIa 催化纤维蛋白交联

维蛋白降解产物（图 16-5）。但血中还存在纤溶酶原活化剂抑制物和纤溶酶抑制物，从而使凝血和纤溶两个过程在正常人体内相互制约，处于动态平衡。如果这种动态平衡破坏，将会发生血栓形成或出血现象。



●图 16-5　纤维蛋白的降解过程及产物

第三节　血细胞物质代谢特点是维持血液生物功能的基础

一、红细胞的代谢特点

红细胞是血液中最主要的细胞，它是在骨髓中由造血干细胞定向分化而成的红系细胞。在红系细胞发育过程中，经历了原始红细胞、早幼红细胞、中幼红细胞、晚幼红细胞、网状红细胞等阶段，最后才成为成熟红细胞。在成熟过程中，红细胞发生一系列形态和代谢的改变。现将这些变化总结于表 16-3。

成熟红细胞除质膜和胞质外，无其他细胞器，其代谢比一般细胞单纯。葡萄糖是成熟红细胞的主要能量物质。

（一）糖代谢

血液循环中的红细胞每天大约从血浆摄取 30g 葡萄糖，其中 90%～95%经糖酵解通路和 2，3-二磷酸甘油酸旁路进行代谢，5%～10%通过磷酸戊糖途径进行代谢。

1. 糖酵解和 2，3-二磷酸甘油酸（2，3-BPG）旁路　红细胞中存在催化糖酵解所需要的所有的酶和中间代谢物（表 16-4），糖酵解的基本反应和其他组织相同。糖酵解是红细

胞获得能量的唯一途径，每摩尔葡萄糖经酵解生成 2mol 乳酸的过程中，产生 2mol ATP 和 2mol NADH＋H^+，通过这一途径可使红细胞内 ATP 的浓度维持在 1.85×10^3mol/L 水平。

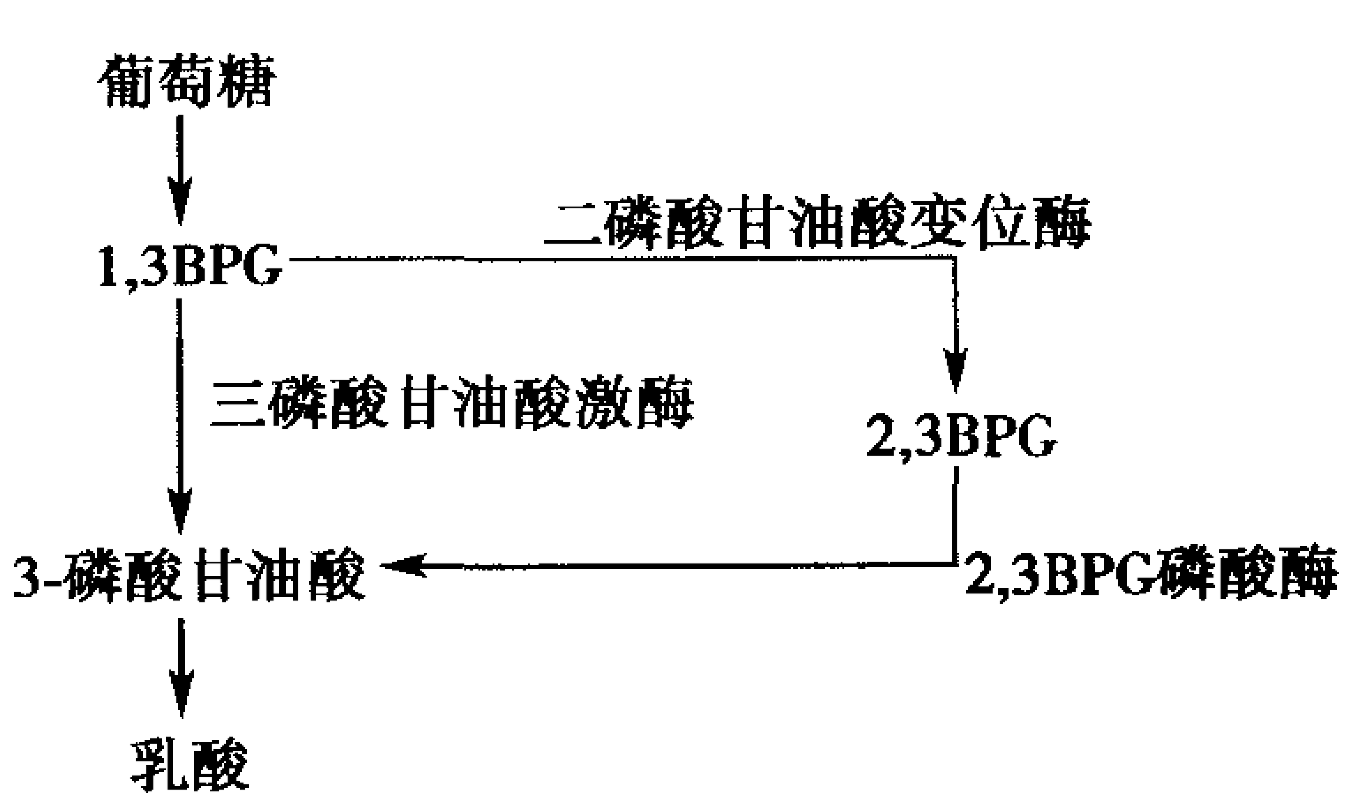
表 16-3　红细胞成熟过程中的代谢变化

代谢能力	有核红细胞	网织红细胞	成熟红细胞
分裂增殖能力	+		
DNA 合成	+*		
RNA 合成	+	−	
RNA 存在	+	+	
蛋白质合成	+	+	
血红素合成	+	+	
脂类合成	+	+	−
三羧酸循环	+	+	-
氧化磷酸化	+	+	−
糖酵解	+	+	+
磷酸戊糖途径	+		+

注：“＋”，“－”分别表示该途径有或无
　* 晚幼红细胞为“－”

表 16-4　红细胞中糖酵解中间产物的浓度（mol/L）

糖酵解中间产物	动脉血	静脉血	糖酵解中间产物	动脉血	静脉血
葡糖 6-磷酸	30.0	24.8	2 磷酸甘油酸	5.0	1.0
果糖-6-磷酸	9.3	3.3	磷酸烯醇式丙酮酸	10.8	6.6
果糖 1，6-二磷酸	0.8	1.3	丙酮酸	87.5	143.2
磷酸丙糖	4.5	5.0	2，3-二磷酸甘油酸	3400	4940
3-磷酸甘油酸	19.2	16.5			



●图 16-6　2,3BPG 旁路

红细胞内的糖酵解途径还存在侧支循环——2，3-二磷酸甘油酸旁路（图 16-6）。2，3-二磷酸甘油酸旁路的分支点是 1，3-二磷酸甘油酸（1，3-BPG）。正常情况下，2，3-BPG 对二磷酸甘油酸变位酶的负反馈作用大于对 3-磷酸甘油酸激酶的抑制作用，所以 2，3-二磷酸甘油酸支路仅占糖酵解的 15%～50%，但是由于 2，3-BPG 磷酸酶的活性较低，2，3-BPG 的生成大于分解，造成红细胞内 2，3-BPG 升高。红细胞内 2，3-BPG 虽然也能供能，但主要功能是调节血红蛋白的运氧功能。

2. 磷酸戊糖途径红细胞内磷酸戊糖途径的代谢过程与其他细胞相同，主要功能是产生 NADPH＋H^+。

3. 红细胞内糖代谢的生理意义

（1）ATP 的功能：红细胞中的 ATP 主要用于维持以下几方面的生理活动：

1）维持红细胞膜上钠泵（Na^+-K^+-ATP 酶）的运转，Na^+ 和 K^+ 一般不易通过细胞

膜，钠泵通过消耗 ATP 将 Na^+ 泵出、K^+ 泵入红细胞以维持红细胞的离子平衡以及细胞容积和双凹盘状形态。

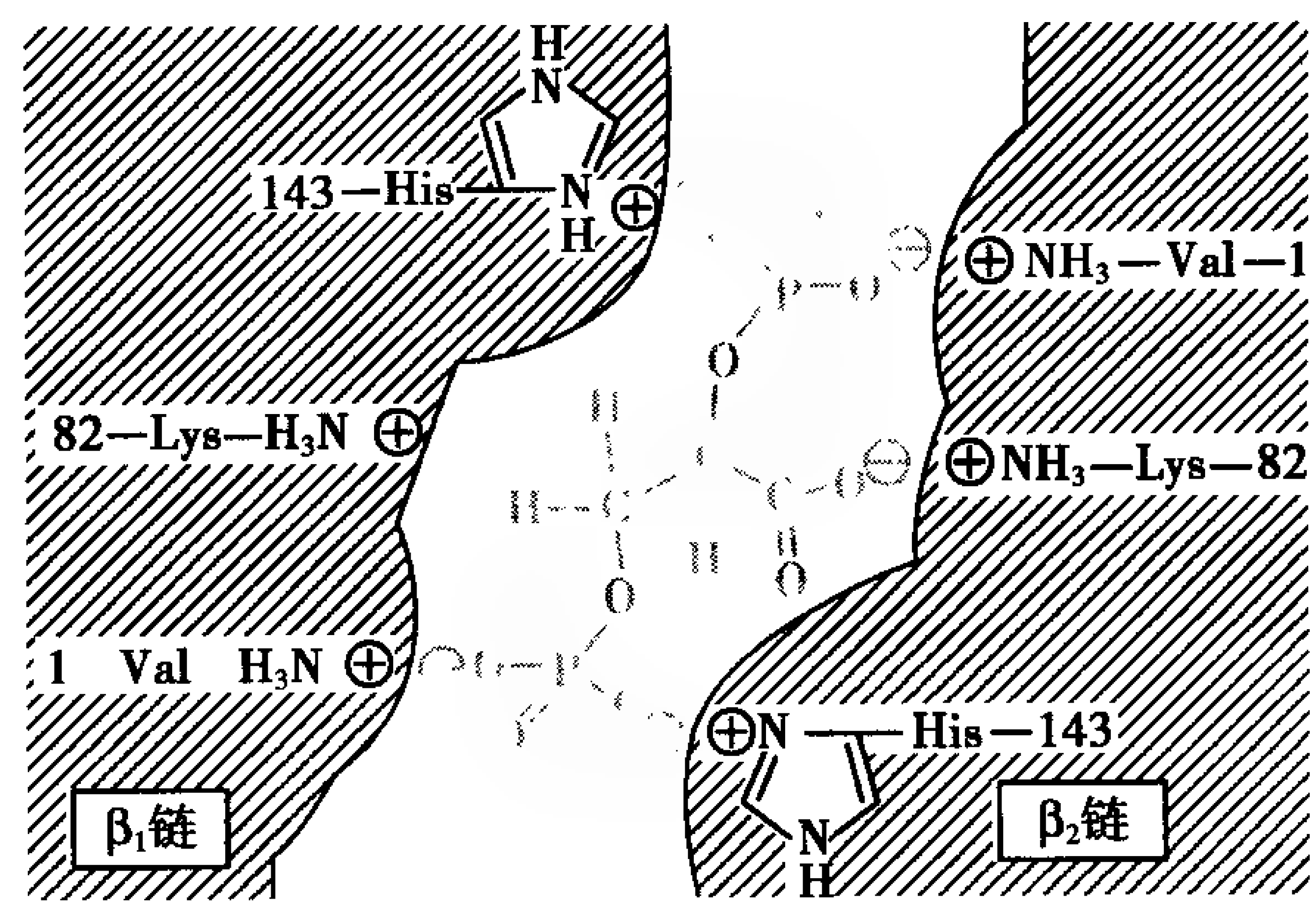
2）维持红细胞膜上钙泵（Ca^{2+}-ATP 酶）的运行，将红细胞内的 Ca^{2+} 泵入血浆以维持红细胞内的低钙状态。正常情况下，红细胞内的 Ca^{2+} 浓度很低（20μmol/L），而血浆的 Ca^{2+} 浓度为 2～3mmol/L。血浆内的钙离子会被动扩散进入红细胞。缺乏 ATP 时，钙泵不能正常运行，钙将聚集并沉积于红细胞膜，使膜失去柔韧性而趋于僵硬，红细胞流经狭窄的脾窦时易被破坏。

3）维持红细胞膜上脂质与血浆脂蛋白中的脂质进行交换。红细胞膜的脂质处于不断的更新中，此过程需消耗 ATP。缺乏 ATP 时，脂质更新受阻，红细胞的可塑性降低，易于破坏。

4）少量 ATP 用于谷胱甘肽、NAD^+ 的生物合成。

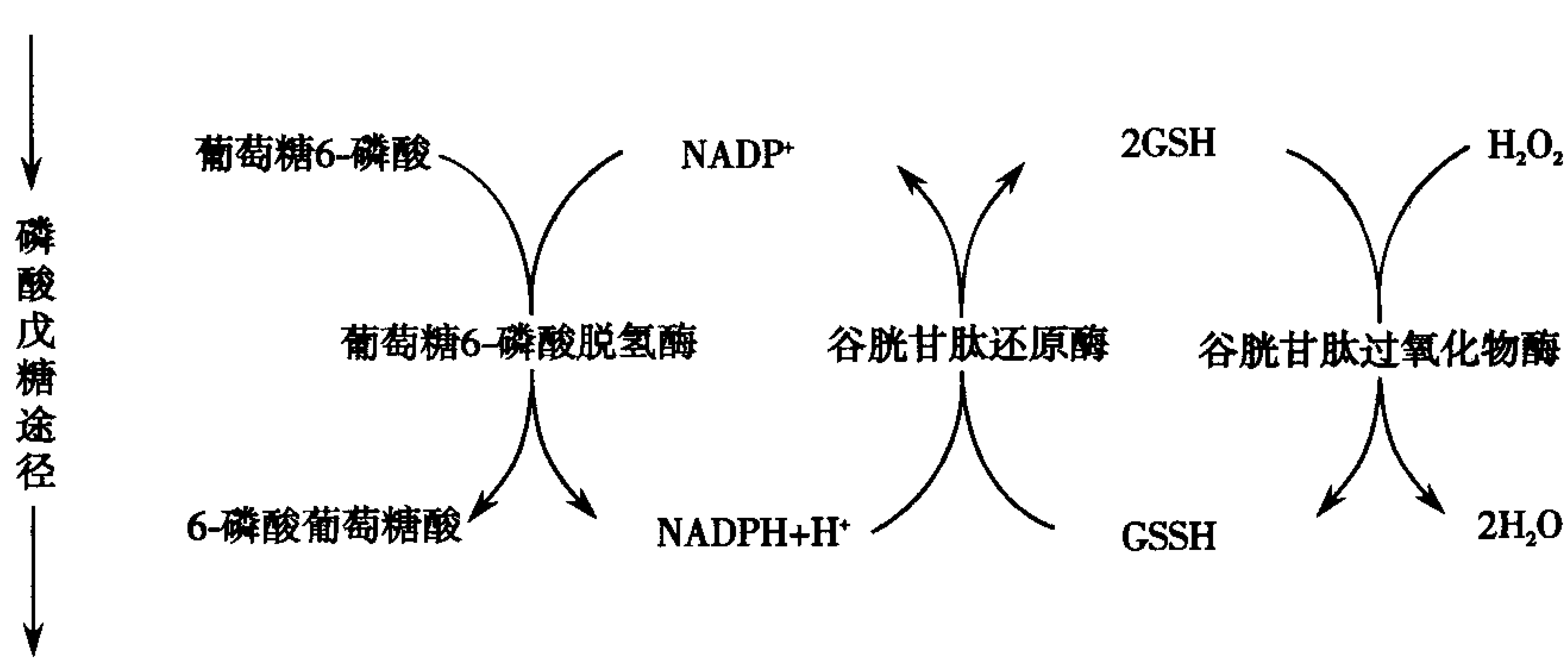
5）ATP 用于葡萄糖的活化，启动糖酵解过程。

（2）2，3-BPG 的功能：2，3-BPG 是调节血红蛋白（Hb）运氧功能的重要因素，它是一个电负性很高的分子，可与血红蛋白结合，结合部位在 Hb 分子 4 个亚基的对称中心孔穴内。2，3-BPG 的负电基团与组成孔穴侧壁的 2 个 β 亚基的带正电基团形成盐键（图 16-7），从而使血红蛋白分子的 T 构象更趋稳定，降低血红蛋白与 O_2 的亲和力。当血流经过 PO_2 较高的肺部时，2，3-BPG 的影响不大，而当血流流过 PO_2 较低的组织时，红细胞中 2，3-BPG 的存在则显著增加 O_2 释放，以供组织需要。在 PO_2 相同条件下，随 2，3-BPG 浓度增大，HbO_2 释放的 O_2 增多。人体能通过改变红细胞内 2，3-BPG 的浓度来调节对组织的供氧。



● 图 16-7 2,3 BPG 与血红蛋白的结合

（3）NADH 和 NADPH 的功能：NADH 和 NADPH 是红细胞内重要的还原当量，它们具有对抗氧化剂，保护细胞膜蛋白、血红蛋白和酶蛋白的巯基等不被氧化，从而维持红细胞的正常功能。磷酸戊糖途径是红细胞产生 NADPH 的唯一途径。红细胞中的 NADPH 能维持细胞内还原型谷胱甘肽（GSH）的含量（图 16-8），使红细胞免遭外源性和内源性氧化剂的损害。



● 图 16-8 谷胱甘肽的氧化与还原及其有关代谢

由于氧化作用，红细胞内经常产生少量高铁血红蛋白（MHb），MHb 中的铁为三价，不能带氧。但红细胞内有 NADH-高铁血红蛋白还原酶和 NADPH-高铁血红蛋白还原酶，

催化 MHb 还原成 Hb。另外，GSH 和抗坏血酸也能直接还原 MHb。在上述高铁血红蛋白还原系统中，以 NADH-高铁血红蛋白还原酶最重要。由于有 MHb 还原系统的存在，使红细胞内 MHb 只占 Hb 总量的 1%～2%。

（二）脂代谢

成熟红细胞的脂类几乎都存在于细胞膜。成熟红细胞已不能从头合成脂肪酸，但膜脂的不断更新却是红细胞生存的必要条件。红细胞通过主动参入和被动交换不断地与血浆进行脂质交换，维持其正常的脂类组成、结构和功能。

（三）血红蛋白的合成与调节

血红蛋白是红细胞中最主要的成分，由珠蛋白和血红素（heme）组成。血红素不但是 Hb 的辅基，也是肌红蛋白、细胞色素、过氧化物酶等的辅基。血红素可在体内多种细胞内合成，参与血红蛋白组成的血红素主要在骨髓的幼红细胞和网织红细胞中合成。

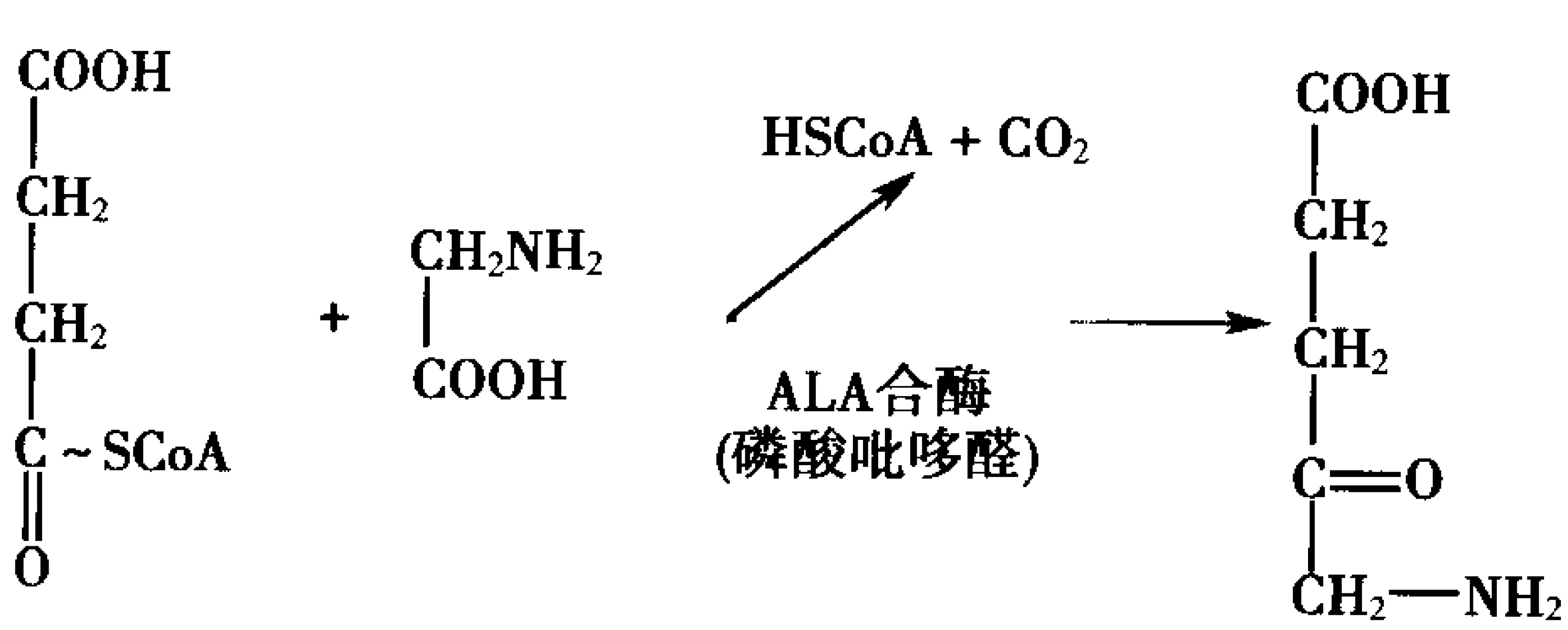
血红素的发现

德国有机化学家 H. Fischer 于 1930 年因色素方面研究成就，获诺贝尔化学奖。他完成了对人造血红素的研制，确定了全部叶绿素的结构，并且证实了叶绿素和血红素之间在化学结构方面有许多相似之处；叶绿素和血红素的活性核心部分都是由卟啉构成。

1. 血红素的生物合成 合成血红素的基本原料是甘氨酸、琥珀酰 CoA 和 Fe^{2+}。合成的起始和终末阶段均在线粒体内进行，而中间阶段在胞质内进行。血红素的生物合成可受多种因素的调节。

（1）合成过程：同位素示踪实验表明，血红素合成的原料是琥珀酰辅酶 A、甘氨酸和 Fe^{2+} 等简单小分子化合物。血红素的生物合成可分为四个步骤。

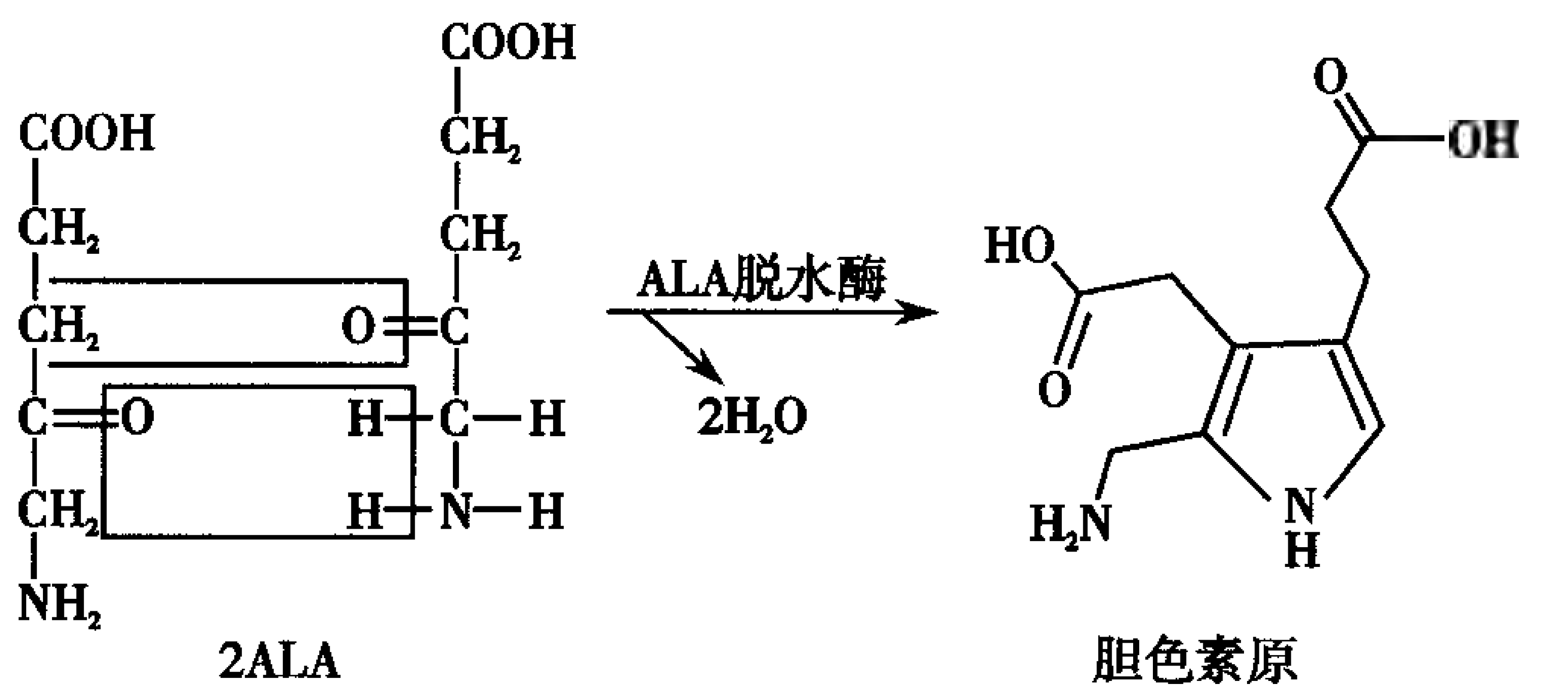
1）δ-氨基-γ-酮戊酸（ALA）的合成：在线粒体内，由琥珀酰辅酶 A 与甘氨酸缩合生成 δ-氨基-γ-酮戊酸（δ-aminolevulinic acid，ALA）（图 16-9）。催化此反应的酶是 ALA 合酶（ALA synthase），其辅酶是磷酸吡哆醛。此酶是血红素合成的限速酶，受血红素的反馈调节。



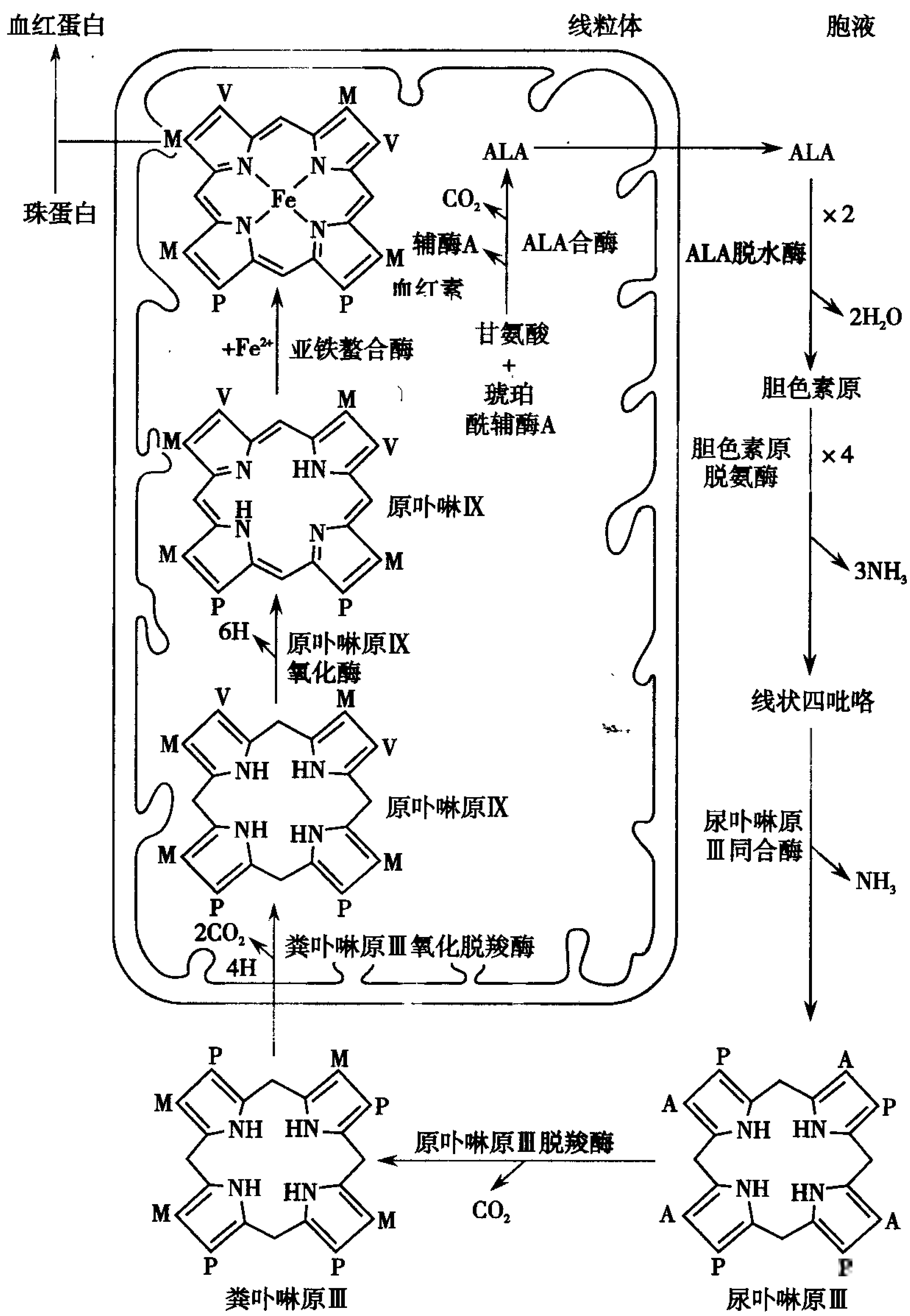
●图 16-9 δ-氨基-γ-酮戊酸的合成

2）胆色素原的合成：ALA 生成后从线粒体进入胞液，在 ALA 脱水酶（ALA dehydrase）催化下，2 分子 ALA 脱水缩合生成 1 分子胆色素原（prophobilinogen，PBG）（图 16-10）。ALA 脱水酶含有巯基。对铅等重金属的抑制作用十分敏感。

3）尿卟啉原与粪卟啉原的合成：在胞液中，由尿卟啉原Ⅰ同合酶（UPGⅠ cosynthase，又称胆色素原脱氨酶）催化，使 4 分子胆色素原脱氨缩合生成 1 分子线状四吡咯，后者再由 UPGⅢ同合酶催化生成尿卟啉原Ⅲ（UPGⅢ）。这两种酶的关系尚不清楚。但是 UPGⅢ同合酶单独存在时并无活性，必须与 UPGⅠ同合酶协同作用；反之，若无 UPGⅢ同合酶时，线状四吡咯化合物不稳定，可自然环化生成尿卟啉原Ⅰ（UPGⅠ）。UPGⅠ与 UPGⅢ的区别是，前者第 7 位侧链为乙酸基（A），第 8 位为丙酸基（P）；而后者却相反，第 7 位为丙酸基（P），第 8 位为乙酸基（A）（图 16-11）。在正常生理情况下，UPGⅢ的合成是主要途径，UPGⅠ极少（Ⅲ：Ⅰ为



●图 16-10　胆色素原的合成



●图 16-11　血红素的生物合成

A：—CH_2COOH；P：—CH_2CH_2COOH；M：—CH_3；V：—$CHCH_2^-$

10000∶1)。在某些病理情况下，UPGⅢ合成受阻，生成较多的UPGⅠ。

UPGⅢ进一步经尿卟啉原Ⅲ脱羧酶催化，使其4个乙酸基（A）侧链脱羧基变为甲基（M），从而生成粪卟啉原Ⅲ（coproporphyrinogen Ⅲ，CPGⅢ），反应如图16-11所示。

4）血红素的生成：胞液中生成的粪卟啉原Ⅲ再进入线粒体，经粪卟啉原Ⅲ氧化脱羧酶作用，使其2，4位两个丙酸基（P）氧化脱羧变成乙烯基（V），从而生成原卟啉原Ⅸ，再由原卟啉原Ⅸ氧化酶催化，使其四个连接吡咯环的甲烯基氧化成甲炔基，则成为原卟啉Ⅸ（protoporphyrin Ⅸ）。通过亚铁螯合酶（ferrochelatase）又称血红素合成酶的催化，原卟啉Ⅸ和Fe^{2+}结合，生成血红素（图16-11）。铅等重金属对亚铁螯合酶也有抑制作用。

血红素生成后从线粒体转运到胞液，在骨髓的有核红细胞及网织红细胞中，与珠蛋白结合成为血红蛋白。血红素合成的全过程总结于图16-11。血红素合成的特点可归结如下：①体内大多数组织均具有合成血红素的能力，但合成的主要部位是骨髓与肝，成熟红细胞不含线粒体，故不能合成血红素。②血红素合成的原料是琥珀酰辅酶A、甘氨酸及Fe^{2+}等简单小分子物质。其中间产物的转变主要是吡咯环侧链的脱羧和脱氢反应。各种卟啉原化合物的吡咯环之间无共轭结构，均无色，性质不稳定，易被氧化，对光尤为敏感。③血红素合成的起始和最终过程均在线粒体中进行，而其他中间步骤则在胞液中进行。这种定位对终产物血红素的反馈调节作用具有重要意义。关于中间产物进出线粒体的机制，目前尚不清楚。

（2）合成的调节：血红素的合成受多种因素的调节，其中最主要的调节步骤是ALA的合成。

1）ALA合酶：它是血红素合成体系的限速酶，受血红素的反馈抑制。由于血红素与该酶的底物和产物均不类似，因此可能属于别构抑制。此外，血红素还可以阻抑ALA合酶的合成。由于磷酸吡哆醛是该酶的辅基，维生素B_6缺乏将影响血红素的合成。ALA合酶本身的代谢较快，半衰期约为1小时。正常情况下，血红素合成后迅速与珠蛋白结合成血红蛋白，不致有过多的血红素堆积；血红素结合成血红蛋白后，对ALA合酶不再有反馈抑制作用。如果血红素的合成速度大于珠蛋白的合成速度，过多的血红素可以氧化成高铁血红素，后者对ALA合酶也具有强烈抑制作用。某些固醇类激素，例如睾酮在体内的5-β还原物，能诱导ALA合酶，从而促进血红素的生成。许多在肝中进行生物转化的物质，例如致癌剂、药剂、杀虫剂等，均可导致肝ALA合酶显著增加，因为这些物质的生物转化作用需要细胞色素P_{450}，后者的辅基正是铁卟啉化合物。由此，通过肝ALA合酶的增加，以适应生物转化的要求。

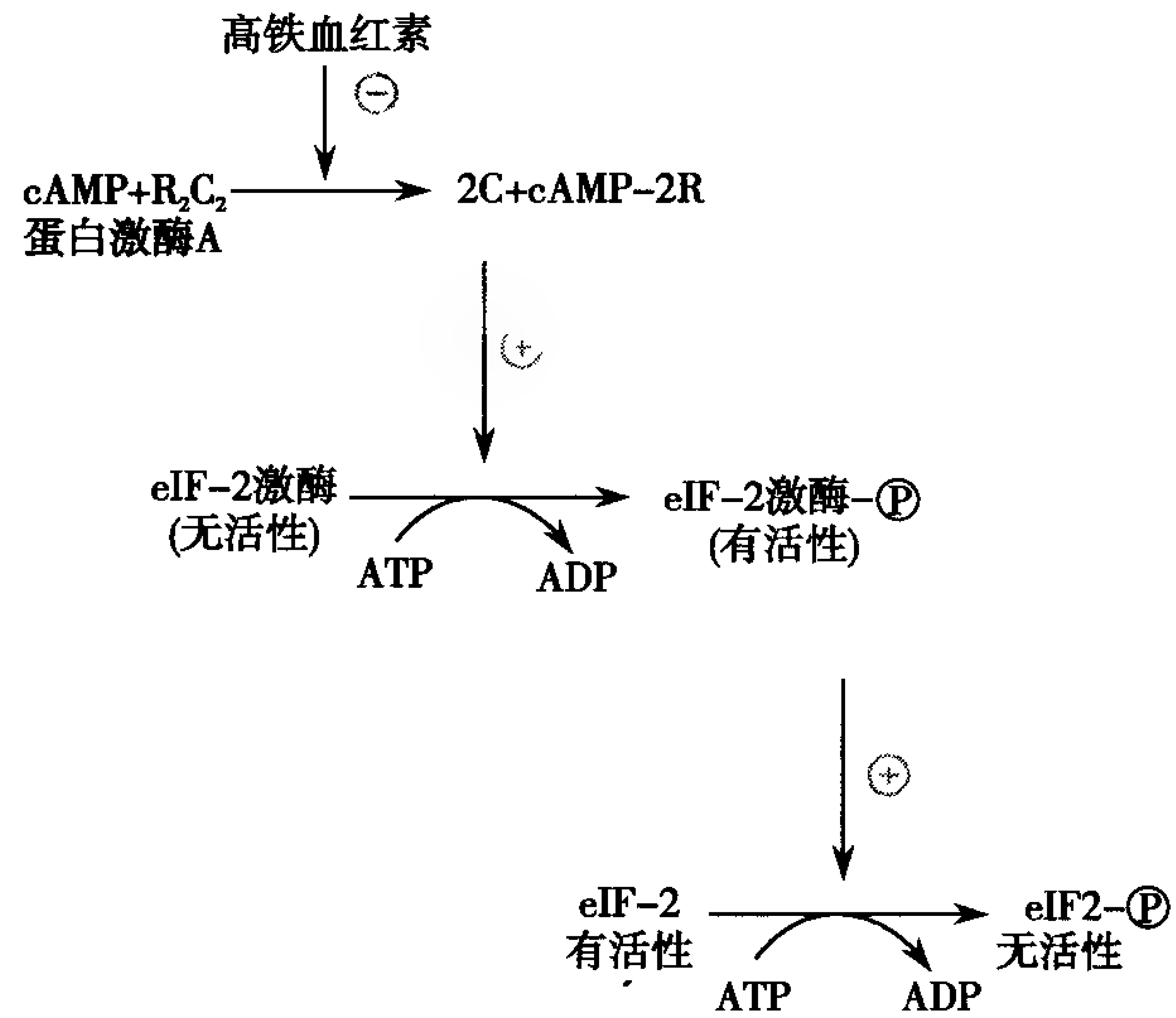
2）ALA脱水酶与亚铁螯合酶：ALA脱水酶虽然也可被血红素抑制，但并不引起明显的生理效应，因为此酶的活性较ALA合酶强80倍，故血红素的抑制基本上是通过ALA合酶而起作用。ALA脱水酶和亚铁螯合酶对重金属的抑制均非常敏感，因此血红素合成的抑制是铅中毒的重要体征。此外，亚铁螯合酶还需要还原剂（如谷胱甘肽），任何还原条件的中断也会抑制血红素的合成。

3）促红细胞生成素（erythropoietin，EPO）：EPO主要在肾合成，缺氧时即释放入血，运至骨髓，借助一种含两个不同亚基和一些结构域的特异性跨膜载体，EPO可同原始红细胞［如BFU-E（爆式红系集落形成单位）和CFU-E（红系集落形成单位）］相互作用，促使它们繁殖和分化，加速有核红细胞的成熟以及血红素和Hb的合成。因此，EPO是红细胞生成的主要调节剂。它是一种由166个氨基酸残基组成的糖蛋白，分子量34kD。编码EPO的cDNA已被分离。

铁卟啉合成代谢异常而导致卟啉或其中间代谢物排出增多，称为卟啉症（porphyria）。卟啉症有先天性和后天性两大类。先天性卟啉症是由某种血红素合成酶系的遗传性缺陷所

致；后天性卟啉症则主要指铅中毒或某些药物中毒引起的铁卟啉合成障碍，例如铅等重金属中毒，除抑制前面提及的两种酶外，还能抑制尿卟啉合成酶。

2. 血红蛋白的合成　血红蛋白中珠蛋白的合成与一般蛋白质相同。珠蛋白的合成受血红素的调控。血红素的氧化产物高铁血红素能促进血红蛋白的合成，其机制见图 16-12。cAMP 激活蛋白激酶 A 后，蛋白激酶 A 能使无活性的 eIF-2 激酶磷酸化。后者再催化 eIF-2 磷酸化而使之失活。高铁血红素有抑制 cAMP 激活蛋白激酶 A 的作用，从而使 eIF-2 保持于去磷酸化的活性状态，有利于珠蛋白，即血红蛋白的合成。



● 图 16-12　高铁血红素对起始因子 2 的调节

二、白细胞的代谢

人体白细胞由粒细胞、淋巴细胞和单核吞噬细胞三大系统组成。主要功能是对外来入侵起抵抗作用，白细胞的代谢与白细胞的功能密切相关。由于淋巴细胞将在免疫学详细介绍，故在此只扼要介绍粒细胞和单核吞噬细胞的代谢。

(一) 糖代谢

由于粒细胞的线粒体很少，故糖酵解是主要的糖代谢途径。中性粒细胞能利用外源性的糖和内源性的糖原进行糖酵解，为细胞的吞噬作用提供能量。单核吞噬细胞虽能进行有氧氧化和糖酵解，但糖酵解仍占很大比重。在中性粒细胞中，约有 10%的葡萄糖通过磷酸戊糖途径进行代谢。中性粒细胞和单核吞噬细胞被趋化因子激活后，细胞内磷酸戊糖途径被激活，产生大量的 NADPH。经 NADPH 氧化酶递电子体系可使 O_2 接受单电子还原，产生大量的超氧阴离子（O_2^-）。超氧阴离子再进一步转变成 H_2O_2，OH・等自由基，起杀菌作用。NADPH 氧化酶递电子体系的成分包括 NADPH 氧化酶、细胞色素 b_{558} 和两种胞液多肽等。

$$2O_2 + NADPH —— 2O_2^- + NADP^+ + H^+$$

(二) 脂代谢

中性粒细胞不能从头合成脂肪酸。单核吞噬细胞受多种刺激因子激活后，可将花生四烯酸转变成血栓烷和前列腺素。在脂氧化酶的作用下，粒细胞和单核吞噬细胞可将花生四烯酸转变成白三烯，它是速发型过敏反应中产生的慢反应物质。

(三) 氨基酸和蛋白质代谢

粒细胞中，氨基酸的浓度较高，尤其含有较高的组氨酸代谢产物——组胺，白细胞激活后，组胺释放参与变态反应。由于成熟粒细胞缺乏内质网，故蛋白质合成量很少。而单核/巨噬细胞的蛋白质代谢很活跃，能合成多种酶、补体和各种细胞因子。

小　结

血液由有形的红细胞、白细胞和血小板以及无形的血浆组成。血浆的主要成分是水、无机盐、有机小分子和蛋白质等。

血浆中的蛋白质浓度为 70～75g/L，多在肝合成。其中含量最多的是清蛋白，其浓度为 38～48g/L，它能结合并转运许多物质，在血浆胶体渗透压形成中起重要作用。血浆中的蛋白质具多种重要的生理功能。

血浆中有 14 种凝血因子，组成内源性凝血系统和外源性凝血系统，保证血管受损时能很快凝血，防止血液大量流失。同时，血液中还有多种抗凝物质和纤溶酶，从而使凝血和纤溶两个过程在正常人体内相互制约，处于动态平衡。如果这种动态平衡破坏，将会发生血栓形成或出血现象。

成熟红细胞代谢的特点是丧失了合成核酸和蛋白质的能力，并不能进行有氧氧化，红细胞功能的正常主要依赖无氧酵解和磷酸戊糖旁路。未成熟红细胞能利用琥珀酰 CoA、甘氨酸和铁离子合成血红素。血红素生物合成的关键酶是 ALA 合酶。

有吞噬功能的白细胞的磷酸戊糖旁路和无氧酵解代谢也很活跃。NADPH 氧化酶递电子体系在白细胞的吞噬功能中起重要作用。

（德 伟 宋惠萍）

第十七章　肝的生物化学

肝是人体最大的实质性器官，也是体内最大的腺体，成人肝组织约重 1500g，约占体重的 2.5%。其独特的形态组织结构和化学组成特点，赋予肝复杂多样的生物化学功能。①肝具有肝动脉和门静脉双重血液供应：使得肝细胞既可从肝动脉中获得由肺及其他组织运来的充足的氧及代谢物，又可从门静脉中获得大量的由肠道吸收的各种营养物质，为肝进行各种物质代谢奠定了物质基础。②肝存在肝静脉和胆道系统双重输出通道：肝静脉与体循环相连，可将肝内的代谢中间物或代谢产物运输到其他组织利用或排出体外；胆道系统与肠道相通，将肝分泌的胆汁排入肠道，并同时排出一些代谢废物。③肝具有丰富的肝血窦：肝动脉和门静脉入肝后经反复分支，形成小叶间动脉及小叶间静脉，最后均进入肝血窦。血窦使肝细胞与血液的接触面积扩大，加之血窦中血流速率减慢，为肝细胞与血液进行充分的物质交换提供了时间保证。④肝细胞含有丰富的细胞器（如内质网、线粒体、溶酶体和过氧化物酶体等）和丰富的酶体系，有些甚至是肝所独有的。使得肝细胞除了存在一般细胞所具有的代谢途径外，还具有一些特殊的代谢功能，如合成尿素及酮体的酶系几乎仅存在于肝细胞。基于上述特点，肝不仅在机体糖、脂类、蛋白质、维生素和激素等物质代谢中处于中心地位，而且肝还具有生物转化、分泌和排泄等方面的生理功能。

第一节　肝在物质代谢中的作用

一、肝是维持血糖水平相对稳定的重要器官

正常情况下，血糖的来源与去路处于动态平衡，主要凭借激素的调节。而血糖调节激素的主要靶器官是肝。肝细胞主要通过调节糖原合成与分解、糖异生途径维持血糖的相对恒定，以保障全身各组织，尤其是大脑和红细胞的能量供应。

肝细胞膜含有葡糖转运蛋白 2（glucose transporter 2，GLUT 2），可使肝细胞内的葡萄糖浓度与血糖浓度保持一致。肝细胞含有特异的己糖激酶同工酶Ⅳ，即葡糖激酶（glucokinase，GK）。葡糖激酶对葡萄糖的 K_m 非常高（10mmol/L），而且不被其产物葡糖 6 磷酸所抑制。这使肝细胞在饱食状态下血糖浓度很高时，仍可不停地将摄取的葡萄糖磷酸化成葡糖-6-磷酸，并将葡糖-6-磷酸进一步合成肝糖原贮存。每公斤肝最多可贮存 65g 糖原，饱食后肝糖原总量可达 75～100g，约占肝重的 5%。血糖高时，葡糖-6-磷酸除氧化供能以及合成糖原储存外，还可在肝内转变成脂肪，并以 VLDL 的形式运出肝外，贮存于脂肪组织。

肝细胞内含有肌肉组织缺乏的葡糖-6-磷酸酶，在空腹状态下，可将肝糖原分解生成的葡糖-6-磷酸直接转化成葡萄糖以补充血糖。肝细胞还存在一系列糖异生的关键酶。长期饥饿时，肝糖原几乎被耗竭，此时肝通过糖异生作用把乳酸、甘油、氨基酸等非糖物质转变成葡萄糖，成为机体在长期饥饿状况下维持血糖相对恒定的主要途径。空腹 24～48 小时后，糖异生可达最大速度。其主要原料氨基酸来自肌肉蛋白质的分解。此时，肝还将脂肪动员所释放的脂酸氧化成酮体，供脑组织利用以节省葡萄糖。肝还能将果糖及半乳糖转化为葡萄糖，作为血糖的补充来源。因此肝细胞严重损伤时，易造成糖代谢紊乱。

肝细胞磷酸戊糖途径也很活跃，为肝的生物转化作用提供足够的 NADPH。此外，肝

细胞中的葡萄糖还通过糖醛酸途径生成 UDP 葡糖醛酸，作为肝生物转化结合反应中最重要的结合物质。

二、肝在脂类代谢中占据中心地位

肝在脂类的消化、吸收、分解、合成及运输等代谢过程中均具有重要作用。

肝细胞合成并分泌胆汁酸，为脂类物质（包括脂溶性维生素）的消化、吸收所必需。肝损伤时，肝分泌胆汁能力下降；胆管阻塞时，胆汁排出障碍，均可出现脂类的消化吸收不良，产生厌油腻和脂肪泻等临床症状。

肝内脂酸的代谢途径有二：内质网中的酯化作用和线粒体内的氧化作用。肝一方面调节脂酸氧化与酯化的关系；另一方面调节乙酰 CoA 进入三羧酸循环氧化分解与合成酮体的关系。肝和脂肪组织之间不断进行脂酸的交换。饥饿时脂库脂肪动员，释放的脂酸进入肝内代谢。肝从血液中摄取脂酸的速度与其血液浓度呈正比。此时，肝内脂酸 β-氧化能力增强，并在肝内经 β 氧化进一步合成酮体。肝是体内产生酮体的唯一器官。酮体则是肝向肝外组织输出脂类能源的一种形式，供肝外组织尤其脑和肌肉氧化利用。饥饿时酮体可占大脑能供的 60%～70%。肝还是合成甘油三酯的主要器官。饱食后，肝将从小肠吸收的和从糖和某些氨基酸转化生成的甘油三酯、磷脂和胆固醇以 VLDL 的形式分泌入血，供肝外组织器官摄取与利用。如若肝合成甘油三酯的量超过其合成与分泌 VLDL 的能力，甘油三酯便积存于肝内。这种情况并不少见，约 50%的肥胖者肝内有少量脂肪堆积。脂肪肝多见于内分泌疾病。糖尿病人肝细胞常有不同程度的脂肪堆积。

肝在调节机体胆固醇代谢平衡上起中心作用。肝是合成胆固醇最活跃的器官，其合成量占全身总合成量的 3/4 以上，是血浆胆固醇的主要来源。胆汁酸的生成是肝降解胆固醇的最重要途径。肝不断将胆固醇转化为胆汁酸，以防止体内胆固醇的超负荷。肝也是体内胆固醇的主要排泄器官，粪便中的胆固醇除来自肠黏膜脱落细胞外，均来自肝。肝可将来自各组织器官和自身合成的胆固醇不加修饰地随胆汁排出体外。肝对胆固醇的酯化也具有重要作用。肝合成与分泌的卵磷脂-胆固醇脂酰基转移酶（lecithin cholesterol acyl transferase，LCAT），在血浆中将胆固醇转化为胆固醇酯以利运输。肝严重损伤时，不仅影响胆固醇合成而且影响 LCAT 的生成，故除血浆胆固醇含量减少外，血浆胆固醇酯的降低往往出现得更早、更明显。

肝是 LDL 降解的重要器官，肝细胞膜上有 LDL 受体，可特异地结合 LDL，并将其内吞入肝细胞降解。HDL 也主要在肝合成，将肝外的胆固醇转移到肝内处理。肝细胞合成的载脂蛋白 C-Ⅱ 可激活肝外组织毛细血管内皮细胞的脂蛋白脂肪酶（LPL），进而水解脂蛋白分子中的甘油三酯。

肝的磷脂合成非常活跃，尤其是卵磷脂的合成。磷脂合成障碍可影响 VLDL 的合成和分泌，导致脂肪运输障碍而在肝中堆积。食物中的可用于卵磷脂合成的胆碱或作为甲基供体的甲硫氨酸可用于干预脂肪肝的发生。

三、肝的蛋白质合成及分解代谢均非常活跃

肝在人体蛋白质合成、分解和氨基酸代谢中起重要作用。

肝细胞的一个重要功能是合成与分泌血浆蛋白质（表 17-1）。肝除合成自身固有蛋白外，还可合成与分泌 90%以上的血浆蛋白质。除 γ-球蛋白外，几乎所有的血浆蛋白均来自于肝，如清蛋白、凝血酶原、纤维蛋白原、α_1-抗凝血酶、α_2-巨球蛋白、铜蓝蛋白、凝

血因子Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅸ和Ⅹ等。血浆脂蛋白所含的多种载脂蛋白（apoA、apoB、apoC和apoE等）也是在肝合成的。由于凝血因子大部分由肝合成，因此严重肝细胞损伤时，可出现凝血时间延长及出血倾向。

表 17-1　肝分泌的部分血浆蛋白质

蛋白质	分子量（亚基数目）	结合的配基或主要功能	含糖（%）	血浆浓度（mg/100ml）
清蛋白	66 000（1）	激素、氨基酸、类固醇、维生素、脂肪酸、胆红素等运输载体		4500～5000
α_1-酸性糖蛋白	40 000（1）	参与炎症应答	45	痕量
α_1-抗胰蛋白酶	54 000（1）	丝氨酸蛋白酶抑制剂	有糖	1.3～1.4
甲胎蛋白	72 000（1）	激素、氨基酸	3～4	胎儿血中存在
α_2-巨球蛋白	720 000（4）	丝氨酸蛋白酶抑制剂	8～10	150～420
抗凝血酶Ⅲ	65 000（1）	与蛋白酶1∶1结合，作为丝氨酸蛋白酶抑制剂	有	17～30
血浆铜蓝蛋白	134 000（1）	6原子铜/分子	有	15～60
C反应蛋白	105 000（5）	补体C1q，参与炎症应答		<1
纤维蛋白原	340 000（2）	纤维蛋白的前体	4	200～450
结合珠蛋白	100 000（2）	与血红蛋白1∶1结合	有	40～180
血液结合素	57 000（1）	与血红素1∶1结合	20	50～100
铁传递蛋白	80 000（1）	2原子铁/分子，转运铁	6	3.0～6.5

血浆清蛋白是机体各组织合成自身蛋白质的原料。肝合成与分泌血浆清蛋白的速度最快。有资料表明，清蛋白从合成到分泌仅需20～30分钟。成人肝每日约合成12g清蛋白，约占全身清蛋白总量的1/20，几乎占肝合成蛋白质总量的1/4。血浆清蛋白除了作为许多脂溶性物质（如游离脂酸、胆红素等）的非特异性运输载体外，在维持血浆胶体渗透压方面起着重要作用。每克清蛋白可使18ml水保持在血液循环中。若血浆清蛋白低于30g/L，约有半数病人出现水肿或腹水。正常人血浆清蛋白（A）与球蛋白（G）的比值（A/G）为1.5～2.5。肝功能严重受损时，血浆清蛋白可因合成减少而浓度降低，可致A/G比值下降，甚至倒置。此种变化临床上可作为严重慢性肝细胞损伤的辅助诊断指标。

胚胎期肝可合成一种结构与清蛋白相近的甲胎蛋白（α-fetoprotein），胎儿出生后其合成受到抑制，正常人血浆中很难检出。原发性肝癌细胞中甲胎蛋白基因的表达失去阻遏，血浆中可能再次检出此种蛋白质，是原发性肝癌的重要肿瘤标志物，对肝癌诊断有一定价值。

肝还是清除血浆蛋白质（清蛋白除外）的重要器官。大多数血浆蛋白都是糖蛋白。含有糖基的血浆蛋白质在肝细胞膜唾液酸酶催化下脱去其糖基末端的唾液酸，并被肝细胞膜血窦域存在的特异的受体-肝糖结合蛋白所识别，经胞吞作用进入肝细胞，并在溶酶体中降解。肝清除血浆蛋白质的速度很快，这种特异性受体每清除1个无唾液酸糖蛋白分子仅需16分钟。

肝是体内除支链氨基酸（亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸）以外的所有氨基酸分解和转变的重要场所。肝中转氨基、脱氨基、脱硫、脱羧基、转甲基等反应均很活跃。当肝细胞受损或任何原因引起肝细胞膜通透性增加时，主要定位于肝细胞内的丙氨酸氨基转移酶（ALT）等逸出细胞进入血浆使酶活性增高，临床上对血浆中这些酶的活性的检测有助于肝病的辅助诊断。

肝的另一重要功能是解氨毒。氨是氨基酸分解代谢的重要产物。肠道产氨是血氨的主要来源，每日肠道产氨4g，其中约90%来自尿素的肠菌水解。肝是清除血氨的主要器官。肝通过鸟氨酸循环将有毒的氨合成无毒的尿素。正常肝每日可合成20～30g尿素。其次，肝还可将氨转变成谷氨酰胺。严重肝病患者，肝合成尿素能力下降，导致血氨升高和氨中

毒，是导致肝性脑病发生的重要生化机制之一。

肝也是胺类物质的重要生物转化器官。正常人体经肝单胺氧化酶作用，可将芳香族氨基酸脱羧基作用产生的苯乙胺、酪胺等芳香族胺加以氧化而清除。严重肝病患者，这些芳香族胺类得不到及时清除，可通过血脑屏障进入脑组织，经羟化后生成苯乙醇胺和多巴胺，其化学结构与儿茶酚胺相似，称为假神经递质（false neurotransmitter），可取代正常神经递质，使大脑发生异常抑制，可能是引发肝性脑病的另一重要生化机制。

四、肝参与多种维生素和辅酶的代谢

肝在维生素的吸收、储存、运输及转化等方面起重要作用。

肝合成和分泌胆汁酸，可促进脂溶性维生素 A、D、E 和 K 的吸收。肝是机体含维生素 A、K、B_1、B_2、B_6、B_{12}、泛酸和叶酸较多的器官。人体内维生素 A、E、K 及 B_{12} 主要储存于肝，肝中维生素 A 的含量占体内总量的 95%。肝合成和分泌视黄醇结合蛋白，后者与视黄醇结合在血液中运输。肝几乎不储存维生素 D，但具有合成维生素 D 结合蛋白的能力。血浆中 85% 的维生素 D 代谢物与维生素 D 结合蛋白结合而运输。严重肝病时，该结合蛋白合成减少，可造成血浆总维生素 D 代谢物水平降低。

肝还参与多种维生素的转化。肝可将胡萝卜素转化为维生素 A，将维生素 PP 转变为辅酶Ⅰ（NAD^+）和辅酶Ⅱ（$NADP^+$），将泛酸转变为辅酶 A（CoA），将维生素 B_1 转变为焦磷酸硫胺素（TPP），将维生素 D_3 转化为 25-羟维生素 D_3 等。维生素 K 还是肝参与合成凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ不可缺少的物质。

五、肝参与多种激素的灭活

多种激素在发挥其调节作用后，主要在肝中代谢转化，从而降低或失去其活性，此过程称为激素的灭活（inactivation）。肝细胞膜上存在可与某些水溶性激素特异结合的受体，并通过内吞作用，将激素吞入细胞内进行代谢转化。一些类固醇激素可通过扩散作用进入肝细胞，与肝内的葡糖醛酸或活性硫酸等结合，丧失其活性。严重肝细胞损伤时，激素的灭活功能降低，体内的雌激素、醛固酮、抗利尿激素等水平升高，可出现男性乳房女性化、蜘蛛痣、肝掌（雌激素对小血管的扩张作用）以及水、钠潴留等现象。

第二节 肝的生物转化作用

一、肝的生物转化作用是机体重要的保护机制

（一）生物转化的概念

人体内不可避免地存在许多非营养物质，这些物质既不能作为构建组织细胞的成分，又不能作为能源物质，其中一些还对人体有一定的生物学效应或潜在的毒性作用，长期蓄积则对人体有害。机体在排出这些非营养物质之前，需对它们进行代谢转变，使其水溶性提高，极性增强，易于通过胆汁或尿液排出体外，这一过程称为生物转化作用（biotransformation）。肝是机体内生物转化最重要的器官。体内进行生物转化的非营养物质按其来源分为内源性和外源性两类。内源性物质包括体内物质代谢的产物或代谢中间物（如胺类、胆红素等）以及发挥生理作用后有待灭活的激素、神经递质等一些对机体具有强烈生物学活性的物质。外源性物质系人体在日常生活和（或）生产过程中不可避免接触的异源

物（xenobiotics），如药物、毒物、环境化学污染物、食品添加剂等和从肠道吸收来的腐败产物。这些物质多系脂溶性，均需经过生物转化作用才能排出体外。

（二）生物转化的生理意义

生物转化的生理意义在于：一则生物转化可对体内的大部分非营养物质进行代谢转化，使其生物学活性降低或丧失（灭活），或使有毒物质的毒性减低或消除（解毒）。另则通过生物转化作用可增加这些非营养物质的水溶性和极性，从而易于从胆汁或尿液中排出。但应该指出的是，有些非营养物质经过肝的生物转化作用后，虽然溶解性增加，但其毒性反而增强；有的还可能溶解性下降，不易排出体外。如多环芳烃类化合物——苯丙芘，其本身没有直接致癌作用，但经过生物转化后反而成为直接致癌物。有的药物如环磷酰胺、百浪多息、水合氯醛和中药大黄等需经生物转化才能成为有活性的药物。因此，不能将肝的生物转化作用简单地称为“解毒作用”（detoxification），这体现了肝生物转化作用的解毒与致毒的双重性特点。

二、肝的生物转化包括两相反应

肝的生物转化可分为两相反应。第一相反应包括氧化（oxidation）、还原（reduction）和水解（hydrolysis）。许多物质通过第一相反应，其分子中的某些非极性基团转变为极性基团，水溶性增加，即可大量排出体外。但有些物质经过第一相反应后水溶性和极性改变不明显，还须进一步与葡糖醛酸、硫酸等极性更强的物质相结合，以得到更大的溶解度才能排出体外，这些结合反应（conjugation）属于第二相反应。实际上，许多物质的生物转化反应非常复杂。一种物质有时需要连续进行几种反应类型才能实现生物转化目的，这反映了生物转化反应的连续性特点。如阿司匹林常先水解成水杨酸后再经结合反应才能排出体外。同一种或同一类物质可以进行不同类型的生物转化反应，产生不同的产物，则体现了生物转化反应类型的多样性特点。例如，阿司匹林水解生成水杨酸，后者既可与甘氨酸反应，又可与葡糖醛酸结合。肝内参与生物转化的酶类列于表 17-2。

表 17-2　参与肝生物转化作用的酶类

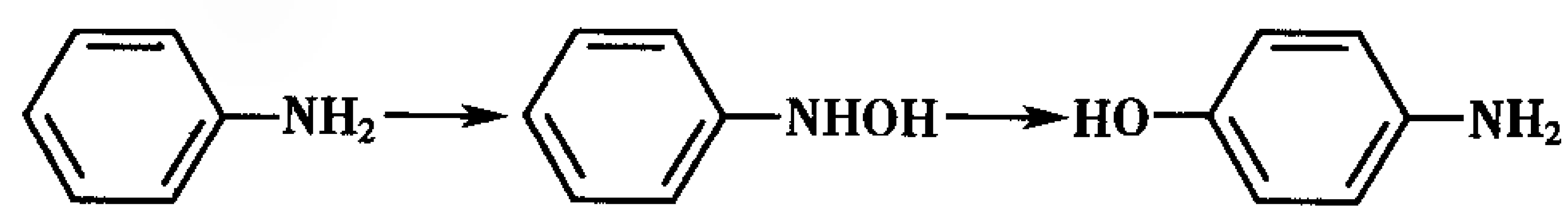
酶　类	辅酶或结合物	细胞内定位
第一相反应		
氧化酶类		
单加氧酶系	$NADPH+H^+$、O_2、P_{450}	内质网
胺氧化酶	黄素辅酶	线粒体
脱氢酶类	NAD^+	胞液或线粒体
还原酶类		
硝基还原酶	$NADH+H^+$ 或 $NADPH+H^+$	内质网
偶氮还原酶	$NADH+H^+$ 或 $NADPH+H^+$	内质网
水解酶类		胞液或内质网
第二相反应		
葡糖醛酸基转移酶	活性葡糖醛酸（UDPGA）	内质网
硫酸基转移酶	活性硫酸（PAPS）	胞液
谷胱甘肽 S-转移酶	谷胱甘肽（GSH）	胞液与内质网
乙酰基转移酶	乙酰 CoA	胞液
酰基转移酶	甘氨酸	线粒体
甲基转移酶	S-腺苷甲硫氨酸（SAM）	胞液与内质网

（一）氧化反应是最多见的生物转化第一相反应

1. 单加氧酶系是氧化异源物最重要的酶 肝细胞中存在多种氧化酶系，其中最重要的是定位于肝细胞微粒体的依赖细胞色素 P_{450} 的单加氧酶系（cytochrome P_{450} monooxygenase，CYP）。单加氧酶系是一个复合物，至少包括两种组分：一种是细胞色素 P_{450}（血红素蛋白）；另一种是 NADPH-细胞色素 P_{450} 还原酶（以 FAD 为辅基的黄酶）。该酶催化氧分子中的一个氧原子加到许多脂溶性底物中形成羟化物或环氧化物，另一个氧原子则被 NADPH 还原成水。故该酶又称羟化酶或混合功能氧化酶（mixed function oxidase，MFO）（详见第六章）。该酶是目前已知底物最广泛的生物转化酶类。据估计，人类基因组至少编码 14 个家族的 CYP。迄今已鉴定出 30 余种人类编码 CYP 的基因。单加氧酶系催化的基本反应如下：

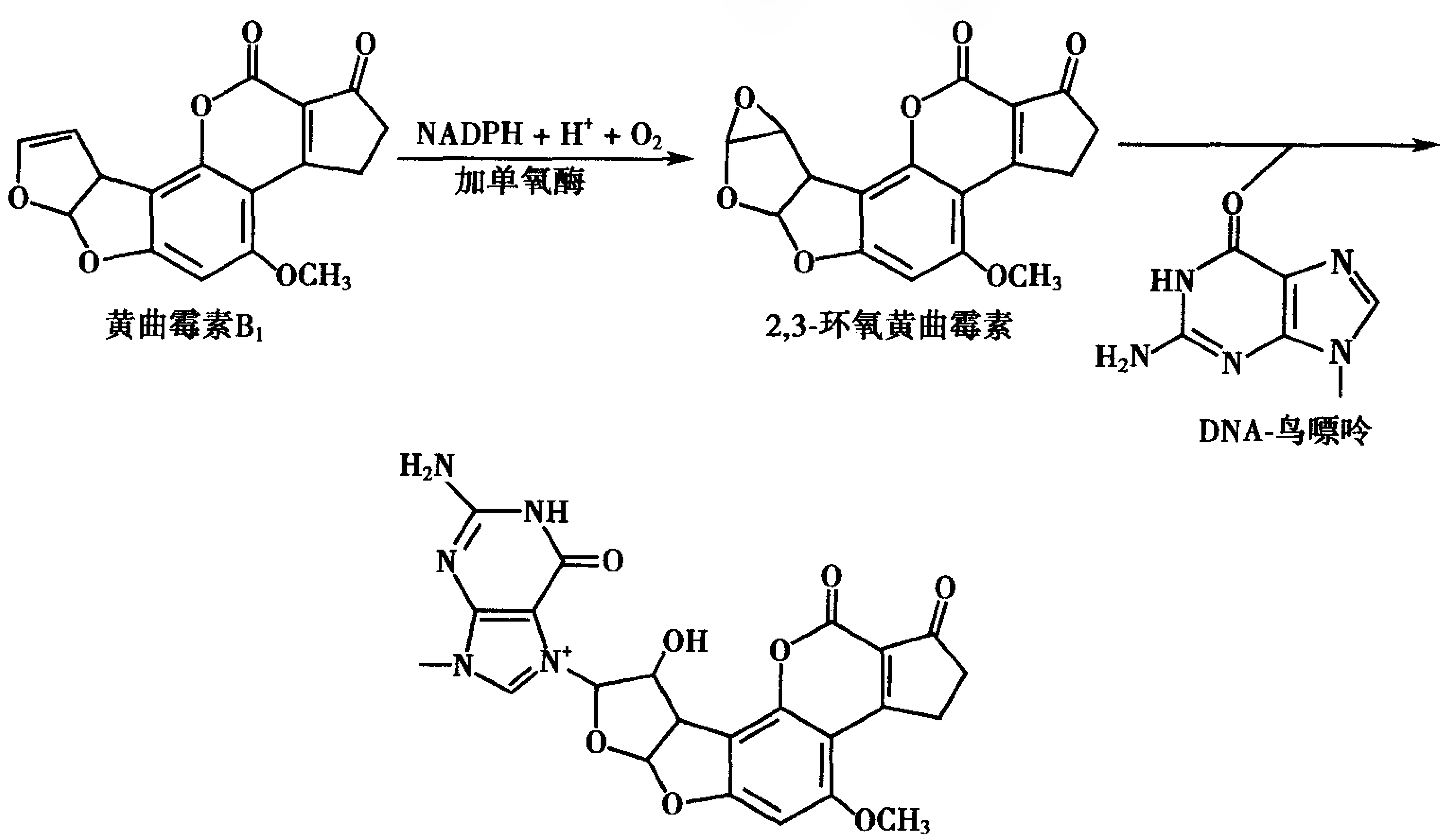
$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{加单氧酶}} ROH + NADP^+ + H_2O$$

其中许多化合物不稳定，再经分子内部的变换，生成稳定的化合物。例如，苯胺在单加氧酶系催化下生成对氨基苯酚。



苯胺　　苯胲　　对氨基苯酚

单加氧酶系的羟化作用不仅增加药物或毒物的水溶性，有利于排泄，而且还参与体内许多重要物质的羟化过程。如维生素 D_3 羟化成为具有生物学活性的维生素 1，25-$(OH)_2D_3$，胆汁酸和类固醇激素合成过程中的羟化作用等。然而应该指出的是，有些致癌物质经氧化后丧失其活性，而有些本来无活性的物质经氧化后却生成有毒或致癌物质。例如，黄曲霉素 B_1 经单加氧酶作用生成的黄曲霉素 2，3-环氧化物可与 DNA 分子中的鸟嘌呤结合，引起 DNA 突变，成为原发性肝癌发生的重要危险因素。



2. 单胺氧化酶类氧化脂肪族和芳香族胺类 存在于肝细胞线粒体内的单胺氧化酶（monoamine oxidase，MAO）是另一类参与生物转化的氧化酶类。属于黄素酶类，可催化蛋白质腐败作用等产生的脂肪族和芳香族胺类物质（如组胺、酪胺、色胺、尸胺、腐胺等）以及一些肾上腺素能药物（如 5-羟色胺、儿茶酚胺类等）的氧化脱氨基作用生成相应

的醛类，后者进一步在胞液中醛脱氢酶催化下进一步氧化成酸，使之丧失生物活性。

$$\underset{\text{胺}}{RCH_2NH_2} + O_2 + H_2O \longrightarrow \underset{\text{醛}}{RCHO} + NH_3 + H_2O_2$$

$$\underset{\text{醛}}{RCHO} + NAD^+ + H_2O \longrightarrow \underset{\text{酸}}{RCOOH} + NADH + H^+$$

3. 醇脱氢酶与醛脱氢酶将乙醇最终氧化成乙酸　肝细胞胞液存在非常活跃的以 NAD^+ 为辅酶的醇脱氢酶（alcohol dehydrogenase，ADH），可催化醇类氧化成醛，后者再由线粒体或胞液醛脱氢酶（aldehyde dehydrogenase，ALDH）催化生成相应的酸类。

$$RCH_2OH + NAD^+ \xrightarrow{\text{醇脱氢酶}} RCHO + NADH + H^+$$

$$RCHO + NAD^+ + H_2O \xrightarrow{\text{醛脱氢酶}} RCOOH + NADH + H^+$$

乙醇（ethanol）作为饮料和调味剂广为人类所利用。人类摄入的乙醇可被胃（吸收30%）和小肠上段（吸收70%）迅速吸收。饮入体内的乙醇约有2%不经转化便从肺呼出或随尿排出，其余部分在肝进行生物转化，由醇脱氢酶与醛脱氢酶将乙醇最终氧化成乙酸。乙醇在体内的氧化速度约为2.2mmol/(kg·h)［100mg/(kg·h)］，相当于70公斤体重的人每小时氧化纯乙醇11毫升。长期饮酒或慢性乙醇中毒除经ADH氧化外，还可使肝内质网增殖并启动肝微粒体乙醇氧化系统（microsomal ethanol oxidizing system，MEOS）。MEOS是乙醇-P_{450}单加氧酶，产物是乙醛，仅在血中乙醇浓度很高时起作用。值得注意的是，乙醇诱导MEOS不但不能使乙醇氧化产生ATP，还可增加对氧和NADPH的消耗，而且还可催化脂质过氧化产生羟乙基自由基，后者可进一步促进脂质过氧化，引发肝损伤。ADH与MEOS的细胞定位及特性见表17-3。

表17-3　ADH与MEOS之间的比较

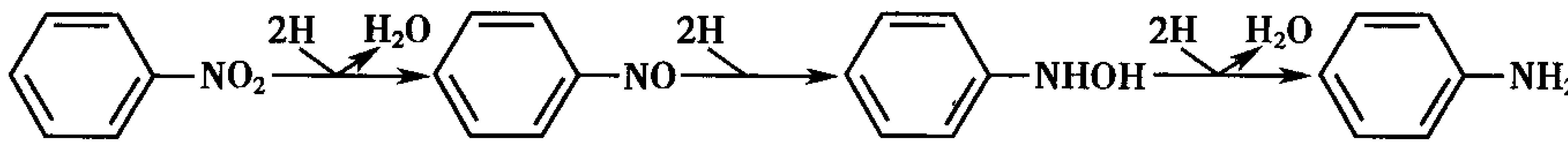
	ADH	MEOS
肝细胞内定位	胞液	微粒体
底物与辅酶	乙醇、NAD^+	乙醇、NADPH、O_2
对乙醇的 K_m 值	2mmol/L	8.6mmol/L
乙醇的诱导作用	无	有
与乙醇氧化相关的能量变化	氧化磷酸化释能	耗能

乙醇经上述两种代谢途径氧化均生成乙醛，后者约90%以上在ALDH的催化下氧化成乙酸。人体肝内ALDH活性最高。ALDH的基因型有正常纯合子、无活性型纯合子和两者的杂合子3型。东方人这3种基因型的分布比例是45∶10∶45。无活性型纯合子完全缺乏ALDH活性，杂合子型部分缺乏ALDH活性。值得提及的是东方人群大约有30%～40%的人ALDH基因有变异，部分ALDH活性低下，此乃该人群饮酒后乙醛在体内堆积，引起血管扩张、面部潮红、心动过速、脉搏加快等反应的重要原因。此外，乙醇的氧化使肝细胞胞液 $NADH/NAD^+$ 比值升高，过多的NADH可将胞液中丙酮酸还原成乳酸。严重酒精中毒导致乳酸和乙酸堆积可引起酸中毒和电解质平衡紊乱，还可使糖异生受阻引起低血糖。

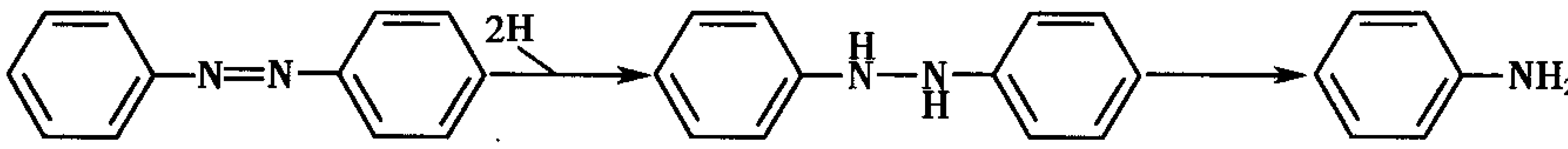
（二）硝基还原酶和偶氮还原酶是第一相反应的主要还原酶

硝基化合物多见于食品防腐剂、工业试剂等。偶氮化合物常见于食品色素、化妆品、纺织与印刷工业等。有些可能是前致癌物。这些化合物分别在微粒体硝基还原酶（nitroreductase）和偶氮还原酶（azoreductase）的催化下，从NADH或NADPH接受氢，

还原生成相应的胺类。例如，硝基苯和偶氮苯经还原反应均可生成苯胺，后者再在单胺氧化酶的作用下，生成相应的酸。

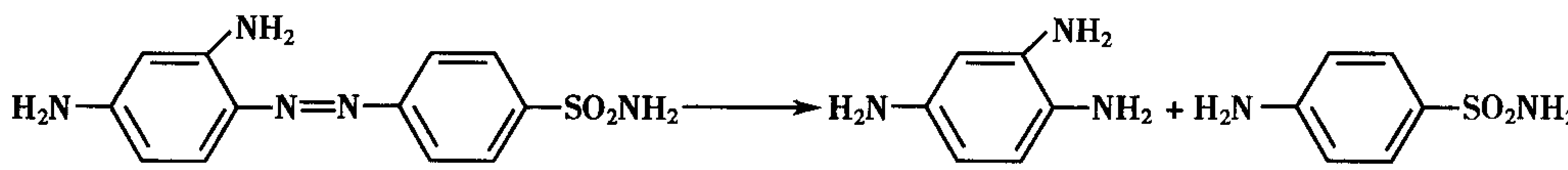


硝基苯　亚硝基苯　苯胲　苯胺



偶氮苯　苯胺

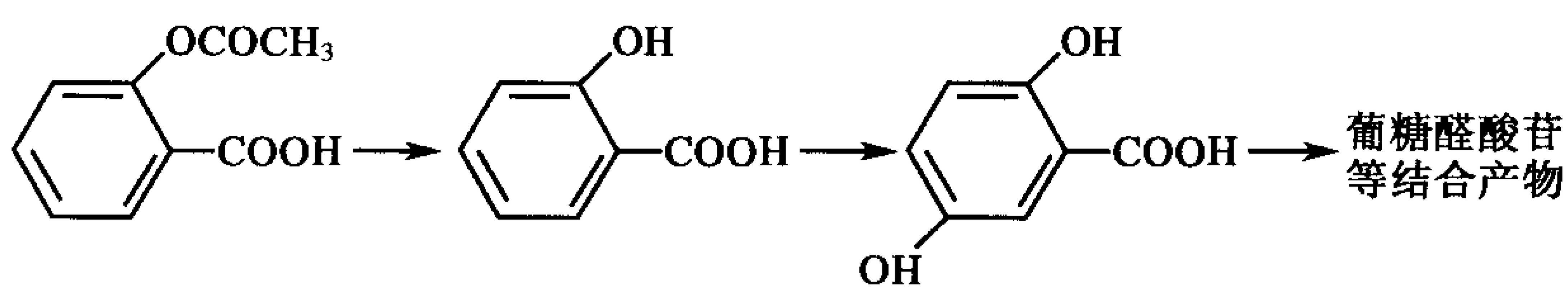
又如，百浪多息是无活性的药物前体，经还原生成具有抗菌活性的氨苯磺胺。



百浪多息　氨苯磺胺

(三) 酯酶、酰胺酶和糖苷酶是生物转化的主要水解酶

肝细胞的胞液与内质网中含有多种水解酶类，主要有酯酶（esterase）、酰胺酶（amidase）和糖苷酶（glucosidase），分别水解酯键、酰胺键和糖苷键类化合物，以减低或消除其生物活性。这些水解产物通常还需进一步反应，以利排出体外。例如，阿司匹林的生物转化过程中，首先是水解反应生成水杨酸，然后是与葡糖醛酸的结合反应。



乙酰水杨酸　水杨酸　羟基水杨酸

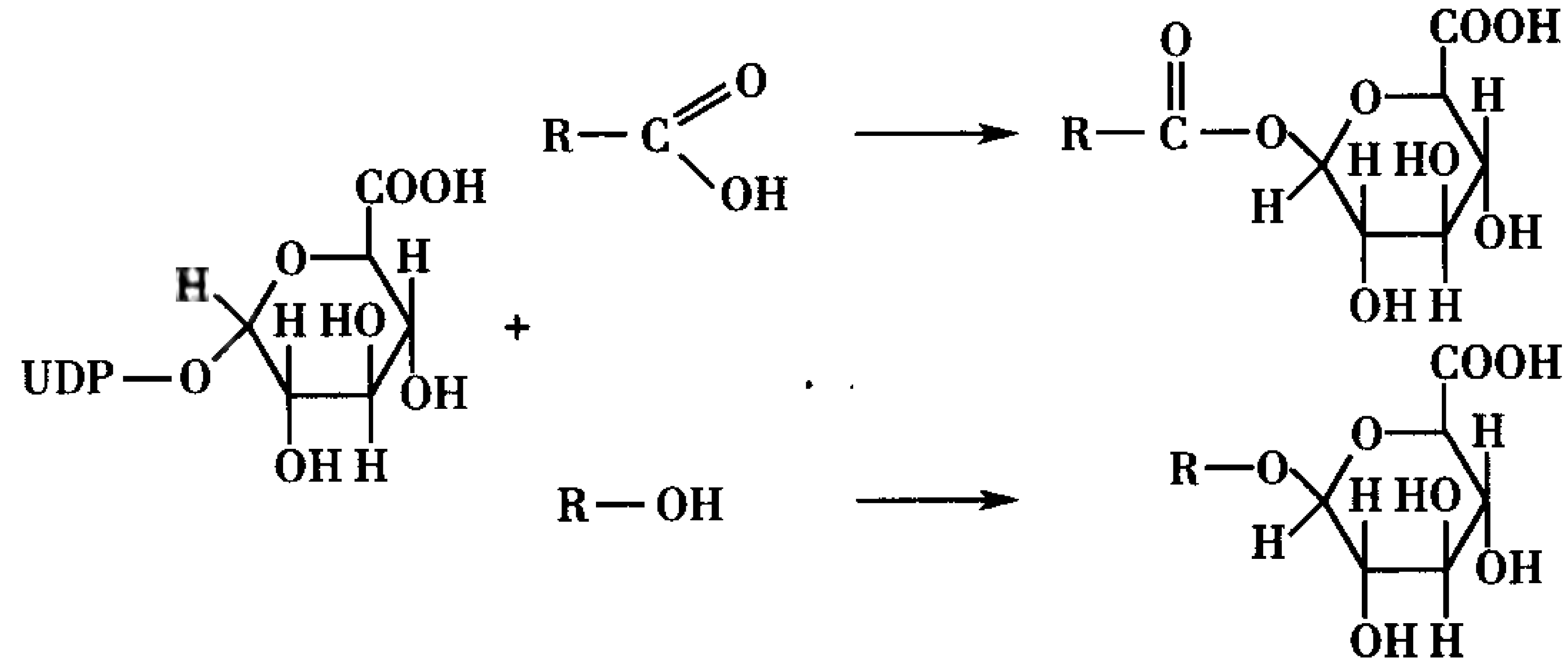
(四) 结合反应是生物转化的第二相反应

第一相反应生成的产物可直接排出体外，或再进一步进行第二相反应，生成极性更强的化合物。有些非营养物质也可不经过第一相反应而直接进入第二相反应。肝细胞内含有许多催化结合反应的酶类。凡含有羟基、羧基或氨基的药物、毒物或激素均可与葡糖醛酸、硫酸、谷胱甘肽、甘氨酸等发生结合反应或进行酰基化和甲基化等反应。其中，以与葡糖醛酸、硫酸和乙酰基的结合反应最为重要，尤以与葡糖醛酸的结合最为普遍。

1. 葡糖醛酸结合是最重要、最普遍的结合反应 糖代谢过程中产生的尿苷二磷酸葡糖（UDPG）可在肝进一步氧化生成尿苷二磷酸葡糖醛酸（uridine diphosphate glucuronic acid，UDPGA）。

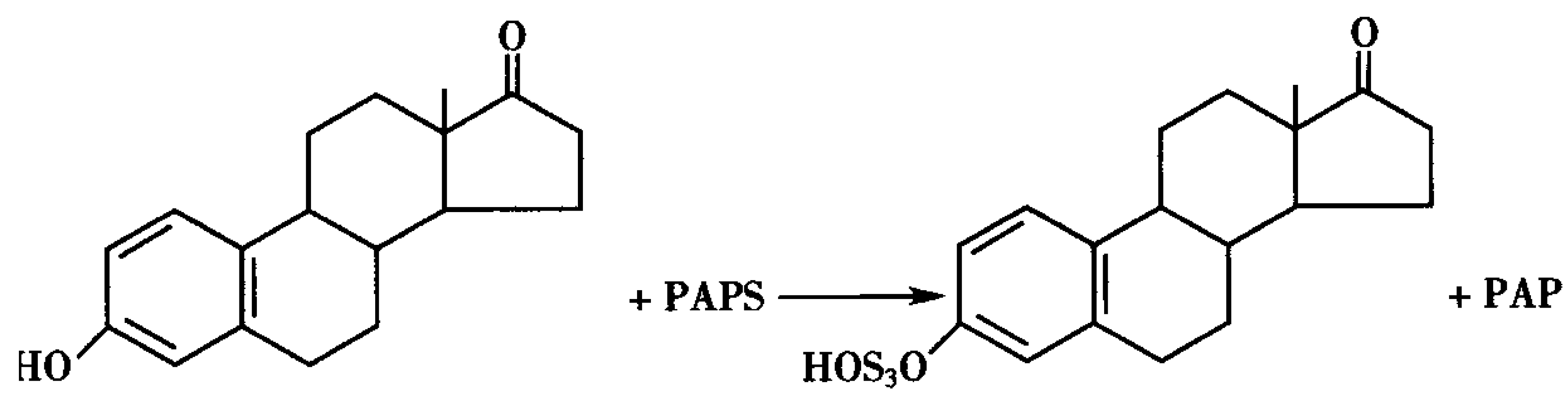
$$\underset{\text{(UDPG)}}{\text{尿苷二磷酸葡糖}} + NAD^+ \xrightarrow{\text{UDPG脱氢酶}} \underset{\text{(UDPGA)}}{\text{尿苷二磷酸葡糖醛酸}} + NADH + H^+$$

肝细胞微粒体的葡糖醛酸基转移酶（UDP glucuronyl transferase，UGT），以UDPGA为葡糖醛酸的活性供体，可催化葡糖醛酸基转移到醇、酚、胺、羧酸类化合物的羟基、羧基及氨基上形成相应的β-D-葡糖醛酸苷，使其极性增加易排出体外。据研究，有数千种亲脂的内源物和异源物可与葡糖醛酸结合，如胆红素、类固醇激素、吗啡和苯巴比妥类药物等均可在肝与葡糖醛酸结合进行转化，进而排出体外。



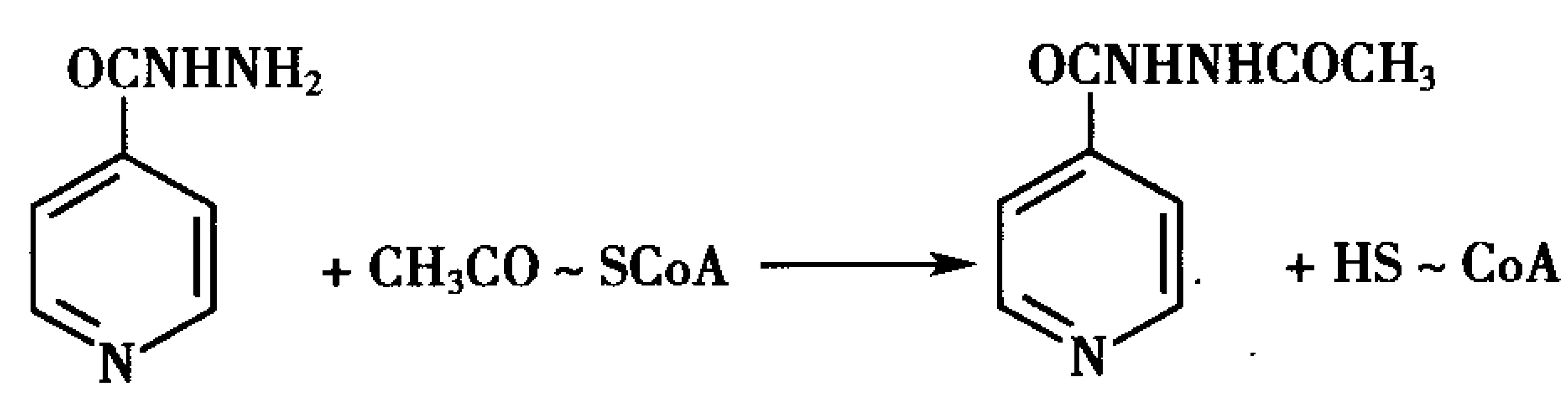
α-D-UDP-葡糖醛酸　异源物　　　　β-D-葡糖醛酸苷

2. 硫酸结合也是常见的结合反应　肝细胞胞液存在硫酸基转移酶（sulfotransferase，SULT），以3′-磷酸腺苷5′-磷酸硫酸（PAPS）为活性硫酸供体，可催化硫酸基转移到醇、酚或芳香胺类等含有—OH的内、外源非营养物质上，生成硫酸酯，使其水溶性增强，易于排出体外。例如雌酮即由此形成硫酸酯而灭活。



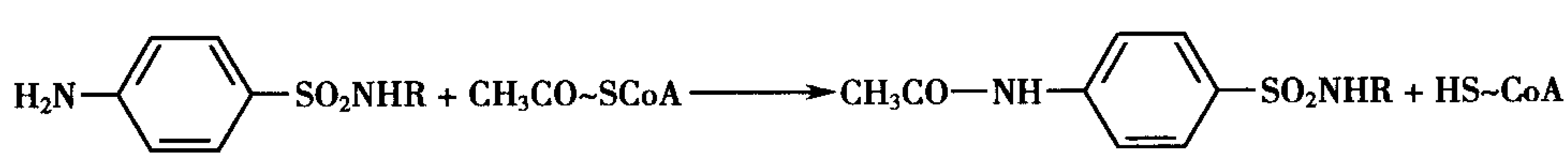
雌酮　　　　　　雌酮硫酸酯

3. 乙酰基化是某些含胺非营养物质的重要转化反应　肝细胞胞液富含乙酰基转移酶（acetyltransferase），以乙酰CoA为乙酰基的直接供体，催化乙酰基转移到含氨基或肼的内、外源非营养物质（如磺胺、异烟肼、苯胺等），形成乙酰化衍生物。例如，抗结核病药物异烟肼在肝内乙酰基转移酶催化下经乙酰化而失去活性。该酶表达呈多态性，使得个体有快速或迟缓乙酰化之分，影响诸如异烟肼等药物在血液中的清除速率，迟缓乙酰化个体对异烟肼的某些毒性反应较之快速乙酰化个体敏感。



异烟肼　　乙酰辅酶A　　乙酰异烟肼　　辅酶A

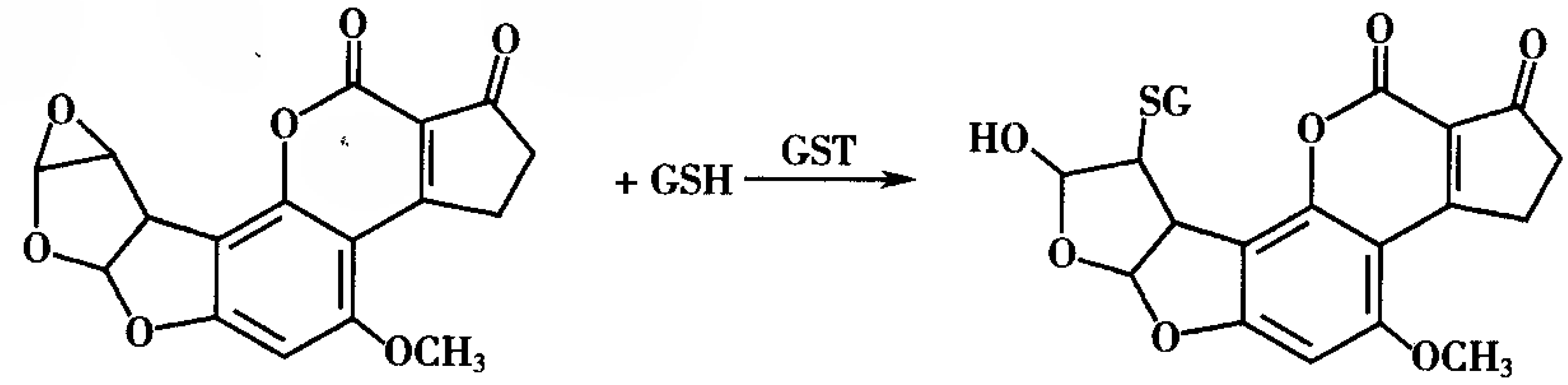
此外，大部分磺胺类药物在肝内也通过这种形式灭活。但应指出，磺胺类药物经乙酰化后，其溶解度反而降低，在酸性尿中易于析出，故在服用磺胺类药物时应服用适量的小苏打，以提高其溶解度，利于随尿排出。



磺胺　　乙酰辅酶A　　N-乙酰磺胺　　辅酶A

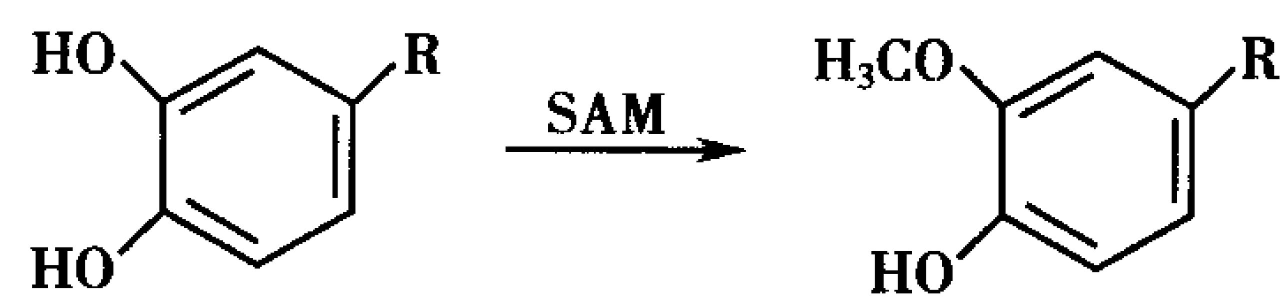
4. 谷胱甘肽结合是细胞应对亲电子性异源物的重要防御反应　肝细胞胞液的谷胱甘肽S-转移酶（glutathione S-transferase，GST），可催化谷胱甘肽（GSH）与含有亲电子中心的环氧化物和卤代化合物等异源物结合，生成GSH结合产物。主要参与对致癌物、环境污染物、抗肿瘤药物以及内源性活性物质的生物转化。该酶在肝中含量非常丰富，占肝细胞可溶性蛋白质的3%～4%。亲电子性异源物若不与GSH结合，则可自由地共价结合DNA、RNA或蛋白质，导致细胞严重损伤。此外，由于很多其内源性底物是受活性氧

修饰过的，所以，GST 具有抗氧化作用。



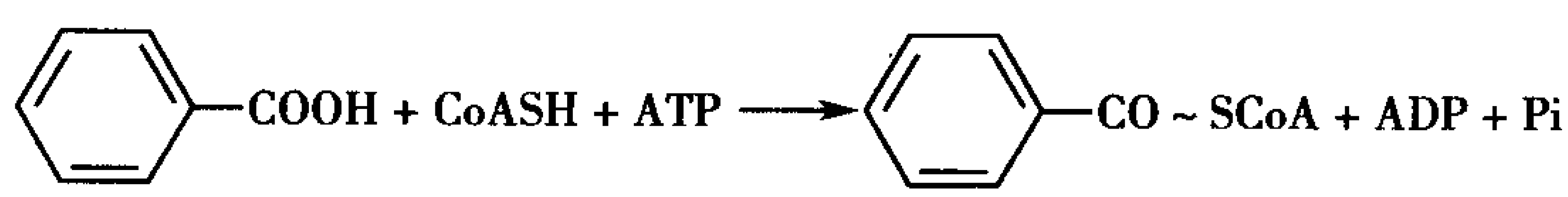
黄曲霉素B_1-8,9-环氧化物　　　　谷胱甘肽结合产物

5. 甲基化反应是代谢内源化合物的重要反应　肝细胞中含有各种甲基转移酶，以 S-腺苷甲硫氨酸（SAM）为甲基供体，催化含有氧、氮、硫等亲核基团的化合物的甲基化反应。其中，胞液中可溶性儿茶酚-O-甲基转移酶（catechol-O-methyltransferase，COMT）具有重要的生理意义。COMT 催化儿茶酚和儿茶酚胺的羟基甲基化，生成有活性的儿茶酚化合物。同时 COMT 也参与生物活性胺如多巴胺类的灭活等。

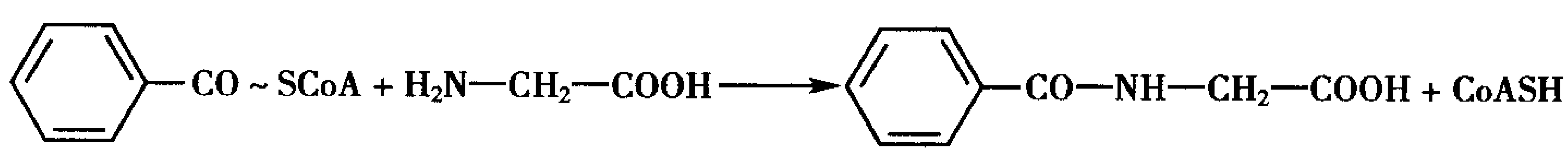


儿茶酚　　　　O-甲基儿茶酚

6. 甘氨酸主要参与含羧基异源物的结合转化　含羧基的药物、毒物等异源物首先在酰基 CoA 连接酶催化下生成活泼的酰基 CoA，再在肝细胞线粒体基质酰基 CoA：氨基酸 N-酰基转移酶（acyl-CoA：amino acid N-acyltransferase）的催化下与甘氨酸结合生成相应的结合产物，如马尿酸的生成。



苯甲酸　　　　苯甲酰CoA



苯甲酰CoA　　　　甘氨酸　　　　马尿酸

胆酸和脱氧胆酸可与甘氨酸或牛磺酸结合生成结合胆汁酸的反应步骤与上述相同。

三、生物转化作用受许多因素的调节和影响

肝的生物转化作用受年龄、性别、营养、疾病、遗传和诱导物等体内、外诸多因素的影响。

（一）年龄、性别、营养、疾病及遗传等因素对生物转化产生明显影响

年龄对生物转化作用的影响很明显。人肝的生物转化酶有一个发育的过程。新生儿肝生物转化酶系发育尚不完善，对内、外源性非营养物质的转化能力较弱，容易发生药物及毒素中毒。新生儿的高胆红素血症与缺乏葡糖醛酸转移酶有关，此酶活性在出生 5～6 天后才开始升高，1 到 3 个月后接近成人水平。老年人肝的生物转化能力仍属正常，尚未发现老年人肝 P_{450} 的羟化作用、葡糖醛酸化作用等有所下降。且老年人肝生物转化酶的诱导作用仍属正常。但老年人肝血流量及肾的廓清速率下降，导致老年人血浆药物的清除率降低，药物在体内的半衰期延长。例如，安替匹林和消炎镇痛药保泰松的半衰期在青年人分别为 12 小时和 81 小时，老年人则分别为 17 小时和 105 小时。常规剂量用药后可发生药

物蓄积，药效强且不良反应较大。因此，临床上对新生儿及老年人的药物用量应较成人为低，许多药物使用时都要求儿童和老人慎用或禁用。但老年人肝的非微粒体酶活性不降低，如氧化乙醇的醇脱氢酶、结合肼苯达嗪和普鲁卡因的乙酰化酶等在体内的代谢并不减慢。

某些生物转化反应有明显的性别差异。例如女性体内醇脱氢酶活性高于男性，女性对乙醇的代谢处理能力比男性强。氨基比林在男性体内的半衰期约 13.4 小时，而女性则为 10.3 小时，说明女性对氨基比林的转化能力比男性强。妊娠期妇女肝清除抗癫痫药的能力升高，但晚期妊娠妇女的生物转化能力普遍降低。

营养状况对生物转化作用亦产生影响。蛋白质的摄入可以增加肝细胞生物转化酶的活性，提高生物转化的效率。饥饿数天（7 天），肝谷胱甘肽 S-转移酶（GST）作用受到明显影响，其参加的生物转化反应水平降低。大量饮酒，因乙醇氧化为乙醛及乙酸，再进一步氧化成乙酰辅酶 A，产生 NADH，可使细胞内 NAD^+/NADH 比值降低，从而减少 UDP-葡糖转变成 UDP-葡糖醛酸，影响了肝内葡萄糖醛酸结合转化反应。

疾病尤其是严重肝病也可明显影响生物转化作用。肝实质损伤直接影响肝生物转化酶类的合成。例如严重肝病时微粒体单加氧酶系活性可降低 50%。肝细胞损害导致 NADPH 合成减少亦影响肝对血浆药物的清除率。肝功能低下对包括药物或毒物在内的许多异源物的摄取及灭活速度下降，药物的治疗剂量与毒性剂量之间的差距减小，容易造成肝损害，故对肝病患者用药应特别慎重。

遗传因素亦可显著影响生物转化酶的活性。遗传变异可引起个体之间生物转化酶类分子结构的差异或酶合成量的差异。变异产生的低活性酶可因影响药物代谢而造成药物在体内的蓄积。相反，变异导致的高活性酶则可缩短药物的作用时间或造成药物代谢毒性产物的增多。目前已知，许多肝生物转化的酶类存在酶活性异常的多态性，如醛脱氢酶、葡糖醛酸基转移酶、谷胱甘肽 S-转移酶等。

（二）许多异源物可诱导生物转化的酶类

许多异源物可以诱导合成一些生物转化酶类，在加速其自身代谢转化的同时，亦可影响对其他异源物的生物转化。例如长期服用苯巴比妥可诱导肝微粒体单加氧酶系的合成，使机体对苯巴比妥类催眠药的转化能力增强，是耐药性产生的重要因素之一。临床上可利用其诱导作用增强对其他某些药物的代谢以达到解毒的效果，如用苯巴比妥减低地高辛中毒。苯巴比妥还可诱导肝微粒体 UDP-葡糖醛酸转移酶的合成，临床上用其增加机体对游离胆红素的结合转化反应，治疗新生儿黄疸。

由于多种物质在体内转化常由同一酶系的催化，因此同时服用多种药物时可出现药物之间对同一转化酶系的竞争性抑制作用，使多种药物的生物转化作用相互抑制，可导致某些药物药理作用强度的改变。例如保泰松可抑制双香豆素类药物的代谢，两者同时服用时保泰松可增强双香豆素的抗凝作用，易发生出血现象，因此同时服用多种药物时应予注意。

此外，食物中亦常含有诱导或抑制生物转化酶的非营养物质。例如烧烤食物、甘蓝、萝卜等含有微粒体单加氧酶系的诱导物，而水田芥则含有该酶的抑制剂。食物中的黄酮类可抑制单加氧酶系的活性。

第三节　胆汁与胆汁酸的代谢

一、胆汁可分为肝胆汁和胆囊胆汁

胆汁（bile）由肝细胞分泌，通过胆管系统进入十二指肠。正常成人平均每天分

泌胆汁 300～700ml。肝胆汁（hepatic bile）是肝细胞初分泌的胆汁，清澈透明，呈橙黄色。肝胆汁进入胆囊后，胆囊壁上皮细胞吸收其中的部分水和其他一些成分，并分泌黏液进入胆汁，从而浓缩成为胆囊胆汁（gallbladder bile）。胆囊胆汁呈暗褐或棕绿色。

胆汁的主要固体成分是胆汁酸盐，约占固体成分的 50%。其次是无机盐、黏蛋白、磷脂、胆固醇、胆色素等。胆汁中还有多种酶类，包括脂肪酶、磷脂酶、淀粉酶、磷酸酶等。除胆汁酸盐和某些酶类与脂类消化、吸收有关；磷脂与胆汁中胆固醇的溶解状态有关外，其他成分多属排泄物。进入机体的重金属盐和药物、毒物、染料等异源物，经肝的生物转化作用后亦可随胆汁排出体外。

两种胆汁的部分性质和百分组成列于表 17-4。

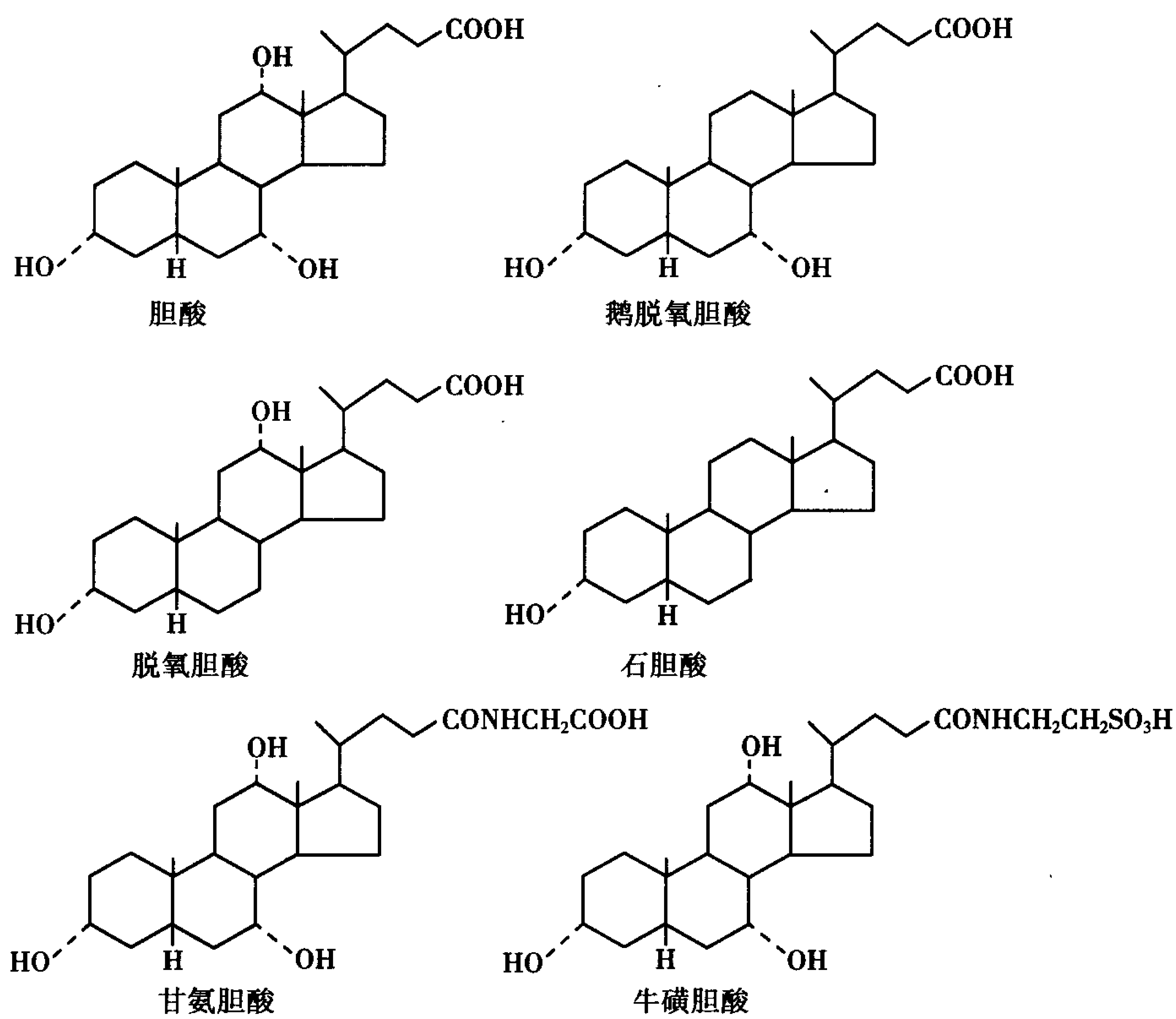
表 17-4 两种胆汁的部分性质和百分组成

	肝胆汁	胆囊胆汁
比重	1.009～1.013	1.026～1.032
pH	7.1～8.5	5.5～7.7
水	96～97	80～86
固体成分	3～4	14～20
无机盐	0.2～0.9	0.5～1.1
黏蛋白	0.1～0.9	1～4
胆汁酸盐	0.5～2	1.5～10
胆色素	0.05～0.17	0.2～1.5
总脂类	0.1～0.5	1.8～4.7
胆固醇	0.05～0.17	0.2～0.9
磷脂	0.05～0.08	0.2～0.5

二、胆汁酸有游离型、结合型及初级、次级之分

正常人胆汁中的胆汁酸（bile acids）按其结构可分为游离胆汁酸（free bile acid）和结合胆汁酸（conjugated bile acid）两大类。游离胆汁酸包括胆酸（cholic acid）、鹅脱氧胆酸（chenodeoxycholic acid）、脱氧胆酸（deoxycholic acid）和少量石胆酸（lithocholic acid）4 种。上述游离胆汁酸的 24 位羧基分别与甘氨酸或牛磺酸结合生成各种相应的结合胆汁酸，包括甘氨胆酸（glycocholic acid）、牛磺胆酸（taurocholic acid）、甘氨鹅脱氧胆酸（glycochenodeoxycholic acid）和牛磺鹅脱氧胆酸（taurochenodeoxycholic acid）。胆汁酸按其来源亦可分为初级胆汁酸（primary bile acid）和次级胆汁酸（secondary bile acid）两类。在肝细胞以胆固醇为原料直接合成的胆汁酸称为初级胆汁酸，包括胆酸、鹅脱氧胆酸及其与甘氨酸或牛磺酸的结合产物。初级胆汁酸在肠道中受细菌作用，第 7 位 α 羟基脱氧生成的胆汁酸称为次级胆汁酸，主要包括脱氧胆酸、石胆酸及其在肝中分别与甘氨酸或牛磺酸结合生成的结合产物。部分胆汁酸的结构见图 17-1。

胆汁中所含的胆汁酸以结合型为主。其中甘氨胆汁酸与牛磺胆汁酸的比例为 3∶1。胆汁中的初级胆汁酸与次级胆汁酸均以钠盐或钾盐的形式存在，形成相应的胆汁酸盐，简称胆盐（bile salts）。



●图 17-1 几种胆汁酸的结构式

胆汁酸在结构上系 24 碳的胆烷酸衍生物，初级胆汁酸中的胆酸含有 3 个羟基（3α、7α、12α），鹅脱氧胆酸含有 2 个羟基（3αμμ、7α）。属于次级胆汁酸的脱氧胆酸和石胆酸的 C-7 位均无羟基存在

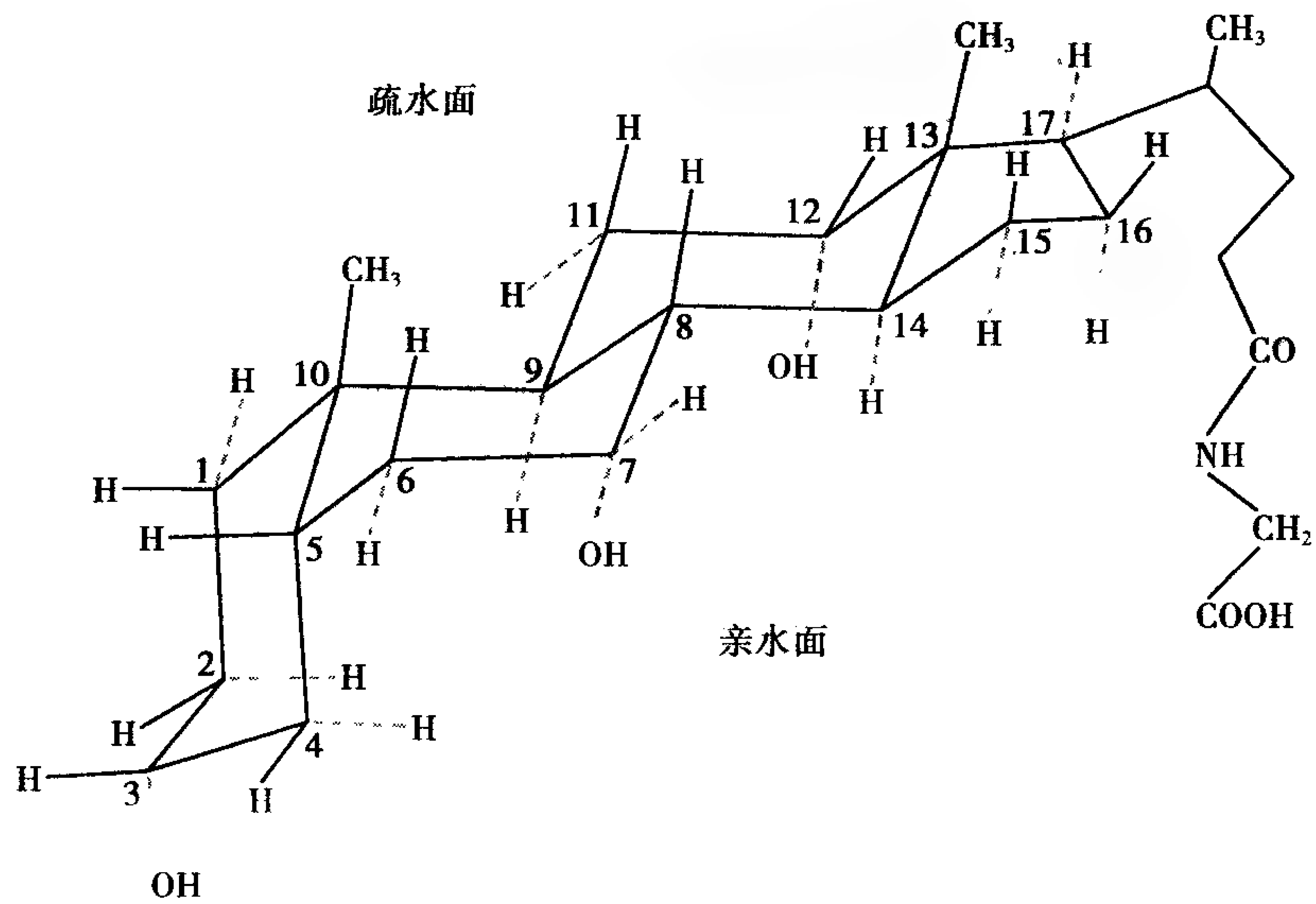
三、胆汁酸的主要生理功能

（一）促进脂类物质的消化与吸收

胆汁酸分子内部既含有亲水性的羟基和羧基，又含有疏水性的烃核和甲基，而且羟基和羧基的空间配位又全是 α 型，位于分子的同一侧构成亲水面，而分子的另一侧构成疏水面，所以胆汁酸的立体构型具有亲水和疏水两个侧面（图 17-2）。这种结构特点赋予胆汁酸很强的界面活性，成为较强的乳化剂，能够降低油/水两相之间的界面张力，使脂类在水中乳化成 3～10μm 的细小微团，增加了脂肪酶的附着面积，有利于脂肪的消化。脂类的消化产物又与胆汁酸盐结合，并汇入磷脂等形成直径只有 20μm 的混合微团，利于通过小肠黏膜的表面水层，促进脂类物质的吸收。

（二）维持胆汁中胆固醇的溶解状态以抑制胆固醇析出

人体内约 99%的胆固醇随胆汁经肠道排出体外，其中 1/3 以胆汁酸形式，2/3 以直接形式排出体外。由于胆固醇难溶于水，在浓缩后的胆囊胆汁中胆固醇较易沉淀析出。胆汁中的胆汁酸盐与卵磷脂协同作用，使胆固醇分散形成可溶性微团，使之不易结晶沉淀而随胆汁排泄。胆固醇是否从胆汁中沉淀析出主要取决于胆汁中胆汁酸盐和卵磷脂与胆固醇之间的合适比例。如果肝合成胆汁酸的能力下降、消化道丢失胆汁酸过多或胆汁酸肠肝循环减少以及排入胆汁中的胆固醇过多（高胆固醇血症）等均可造成胆汁中胆汁酸和卵磷脂与胆固醇的比例下降（小于 10∶1），易发生胆固醇析出沉淀，形成胆结石（gallstone）。胆结石可根据结石组成成分分为胆固醇结石（cholesterol stone）、黑色素结石（black pigment



●图 17-2 甘氨胆酸的立体构型

甘氨胆酸多元环上的 3 个羟基和甘氨酸的羧基位于分子的一侧，形成亲水面；甲基位于分子的另一侧，形成疏水面；该结构赋予其很强的界面活性

stone）和棕色素结石（brown pigment stone）。结石中胆固醇含量超过 50%的称为胆固醇结石，为西方人多见。黑色素结石中胆固醇含量一般为 10%～30%，棕色素结石含胆固醇较少。后两者为东方人多见。不同胆汁酸对结石形成的作用不同，鹅脱氧胆酸可使胆固醇结石溶解，而胆酸和脱氧胆酸则无此作用，临床上常用鹅脱氧胆酸治疗胆固醇结石。

四、胆汁酸的代谢及胆汁酸的肠肝循环

（一）初级胆汁酸在肝内以胆固醇为原料生成

肝细胞以胆固醇为原料合成初级胆汁酸，这是胆固醇在体内的主要代谢去路。正常人每日约合成 1～1.5g 胆固醇，其中约 0.4～0.6g 在肝内转化为胆汁酸。肝细胞合成胆汁酸的反应步骤较复杂，催化各步反应的酶类主要分布于微粒体和胞液。胆固醇首先在胆固醇 7α-羟化酶（cholesterol 7α-hydroxylase）的催化下生成 7α-羟胆固醇。后者向胆汁酸的转化包括固醇核的还原、羟化、侧链的缩短和加辅酶 A 等多步反应，首先生成 24 碳的初级游离胆汁酸即胆酸（3α，7α，12α-三羟-5β-胆烷酸）和鹅脱氧胆酸（3α，7α-二羟-5β-胆烷酸）。后两者再与甘氨酸或牛磺酸结合生成初级结合胆汁酸，以胆汁酸钠盐或钾盐的形式随胆汁入肠。胆固醇 7α-羟化酶是胆汁酸合成的限速酶，而 HMG-CoA 还原酶是胆固醇合成的关键酶，两者均系诱导酶，同时受胆汁酸和胆固醇的调节。胆汁酸浓度升高可同时抑制这两种酶的合成，从而抑制肝细胞胆汁酸、胆固醇的合成；高胆固醇饮食在抑制 HMG-CoA 还原酶合成的同时，诱导胆固醇 7α-羟化酶基因的表达。肝细胞通过这两个酶的协同作用维持肝细胞内胆固醇的水平。糖皮质激素、生长激素可提高胆固醇 7α-羟化酶的活性，甲状腺素可诱导该酶的 mRNA 合成，故甲状腺功能亢进患者血浆胆固醇含量降低。

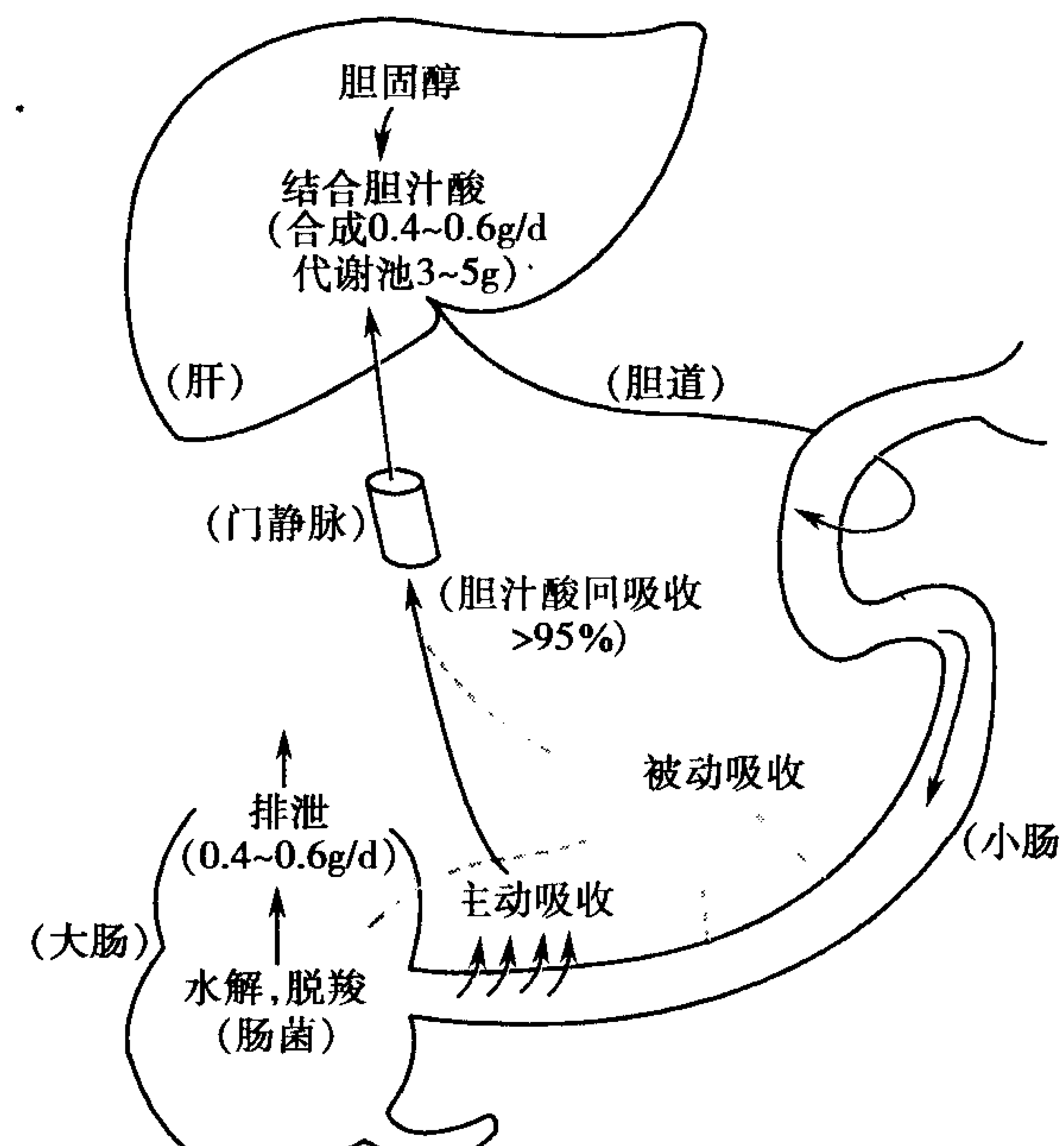
（二）次级胆汁酸在肠道由肠菌作用生成

进入肠道的初级胆汁酸在发挥促进脂类物质的消化吸收后，在回肠和结肠上段，由肠道细菌酶催化胆汁酸的去结合反应和脱 7α-羟基作用，生成次级胆汁酸。即胆酸脱去 7α-羟基生成脱氧胆酸，鹅脱氧胆酸脱去 7α-羟基生成石胆酸。此外，肠菌还可将鹅脱氧胆酸转

化成熊脱氧胆酸，即将鹅脱氧胆酸 7α-羟基转变成 7β-羟基，亦归属次级胆汁酸。熊脱氧胆酸含量很少，对代谢没有重要意义，但有一定的药理意义。熊脱氧胆酸没有细胞毒作用，在慢性肝病时具有抗氧化应激作用，可用于降低肝细胞由于胆汁酸潴留引起的肝损伤，改善肝功能以减缓疾病的进程。

(三) 胆汁酸的肠肝循环使有限的胆汁酸库存循环利用

进入肠道的各种胆汁酸（包括初级和次级、游离型与结合型）约有 95%以上可被肠道重吸收。结合型胆汁酸在回肠部位被主动重吸收，少量未结合的胆汁酸在肠道各部被动重吸收。重吸收的胆汁酸经门静脉重新入肝。在肝细胞内，游离胆汁酸被重新转变成结合胆汁酸，与重吸收及新合成的结合胆汁酸一道，重新随胆汁入肠。胆汁酸在肝和肠之间的这种不断循环过程称为胆汁酸的“肠肝循环”（enterohepatic circulation of bile acid）（图 17-3）。机体内胆汁酸储备的总量称为胆汁酸库（bile acid pool）。成人的胆汁酸库共约 3～5g，即使全部倾入小肠也难满足每日正常膳食中小肠内脂类消化、吸收的需要。人体每天约进行 6～12 次肠肝循环，从肠道吸收的胆汁酸总量可达 12～32g，借此有效的肠肝循环机制可使有限的胆汁酸库存循环利用，以满足机体对胆汁酸的生理需求。



● 图 17-3　胆汁酸的肠肝循环

未被肠道吸收的小部分胆汁酸在肠菌的作用下，衍生成多种胆烷酸的衍生物并由粪便排出。每日机体仅从粪便排出约 0.4～0.6g 胆汁酸盐，与肝细胞合成的胆汁酸量相平衡。此外，经肠肝循环回收入肝的石胆酸在肝中除了与甘氨酸或牛磺酸结合外，还硫酸化生成硫酸甘氨石胆酸和硫酸牛磺石胆酸。这些双重结合的石胆酸在肠道中不容易去结合，亦不容易被肠道重吸收，从粪便中排出。因此，正常胆汁中石胆酸的含量甚微。

第四节　胆色素的代谢与黄疸

胆色素（bile pigment）是体内铁卟啉类化合物的主要分解代谢产物，包括胆绿素（biliverdin）、胆红素（bilirubin）、胆素原（bilinogen）和胆素（bilin）。这些化合物主要随胆汁排出体外，其中胆红素居于胆色素代谢的中心，是人体胆汁中的主要色素，呈橙黄色。胆红素的生成、运输、转化及排泄异常关联临床诸多病理生理过程。熟知胆红素的代谢路径对于临床上伴有黄疸体征的疾病诊断和鉴别诊断具有重要意义。

一、胆红素是铁卟啉类化合物的降解产物

(一) 胆红素主要来源于衰老红细胞的破坏

体内铁卟啉类化合物包括血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素、过氧化氢酶和过氧化物酶等。正常人每天可生成 250～350mg 胆红素，其中约 80%以上来自衰老红细胞破坏所释放的血红蛋白的分解。小部分胆红素来自造血过程中红细胞的过早破坏，还有少量胆红素来

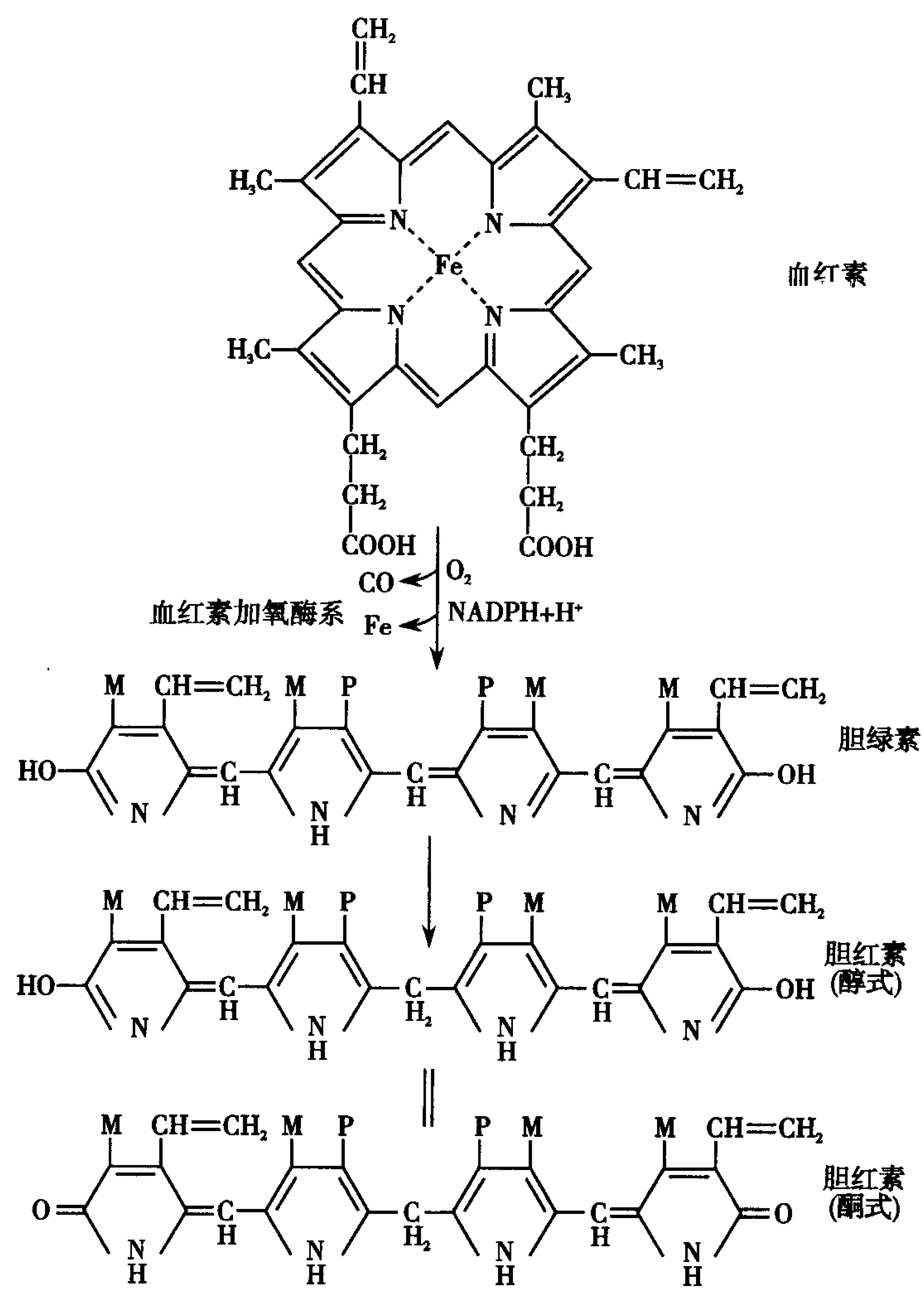
自含铁卟啉的酶类。肌红蛋白由于更新率低，所占比例很小。

红细胞的平均寿命约 120 天。正常人每天约有 2×10^{11} 个红细胞破坏，约释放 6g 血红蛋白。衰老的红细胞被肝、脾、骨髓等单核吞噬系统细胞识别并吞噬，释放出血红蛋白。血红蛋白随后分解为珠蛋白和血红素。珠蛋白可降解为氨基酸供体内再利用。血红素则由单核吞噬系统细胞降解生成胆红素。

（二）血红素加氧酶和胆绿素还原酶催化胆红素的生成

血红素是由 4 个吡咯环连接而成的环形化合物，并螯合 1 个铁离子。血红素由单核吞噬系统细胞微粒体血红素加氧酶（heme oxygenase，HO）的催化，在至少 3 分子氧和 3 分子 NADPH 的存在下，血红素原卟啉Ⅸ环上的 α 甲炔基（—CH＝）桥碳原子的两侧氧化断裂，释放出一分子一氧化碳（CO）和 Fe^{2+}，并将两端的吡咯环羟化，形成线性四吡咯的水溶性胆绿素。释放的铁进入体内铁代谢池，可供机体再利用。

胆绿素进一步在胞液活性很强的胆绿素还原酶（biliverdin reductase）催化下，从 NADPH 获得两个氢原子，还原生成胆红素（图 17-4）。胆红素是由 3 个次甲基桥连接的 4

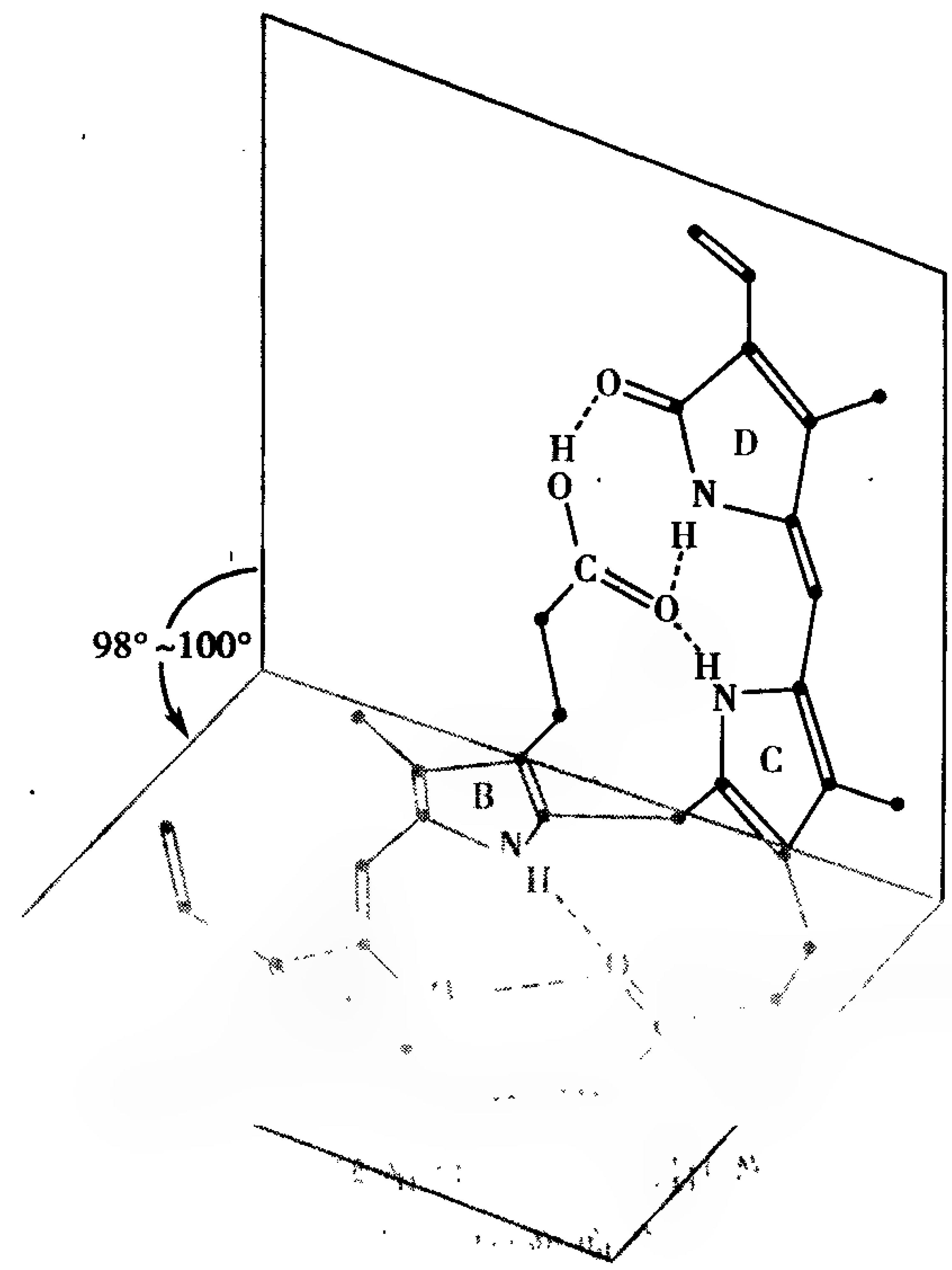


●图 17-4　胆红素的生成

M：—CH_3　P：—CH_3CH_2COOH

血红素原卟啉Ⅸ环上的 α 甲炔基（—CH＝）桥碳原子被氧化使卟啉环打开，形成胆绿素，进而还原为胆红素，甲炔桥的碳转变成 CO，螯合的铁离子释出被再利用

个吡咯环组成，分子量 585。虽然胆红素分子中含有 2 个羟基或酮基、4 个亚氨基和 2 个丙酸基等亲水基团，但由于这些基团形成 6 个分子内氢键，使胆红素分子形成脊瓦状内旋的刚性折叠结构，赋予胆红素以亲脂疏水的性质，易自由透过细胞膜进入血液（图 17-5）。



●图 17-5　胆红素的 X-线衍射结构图

图中 C 环上的丙酸基与 A 环的氧原子和 A、B 环上的氮原子形成氢键；B 环的丙酸基与 C 环的氧原子和 C、D 环上的氮原子形成氢键；A 和 B 环在一个平面，C 和 D 环在一个平面，两平面的夹角为 98°～100°

迄今已发现人体内存在 3 种血红素加氧酶同工酶：HO-1、HO-2 和 HO-3。HO-1（32kD）是一种诱导酶，为热休克蛋白 32（HSP32）。主要存在于肝、脾和骨髓等降解衰老红细胞的组织器官。HO-2（36kD）是构成性酶，主要存在于大脑和睾丸，其不受底物诱导，在大脑内保持恒定的表达，起重要的抗氧化作用。HO-3（33kD）与 HO-2 有 90%的同源性，其功能尚未阐明。HO-1 在血红素代谢中居重要地位，其生物合成可被其底物血红素迅速激活，以及时清除循环系统中的血红素。HO-1 亦是迄今所知的诱导物最多的诱导酶。氧化应激（oxidative stress）、缺氧、内毒素、白细胞介素-10（IL-10）、一氧化氮（NO）、促红细胞生成素、炎症等许多因素均可诱导此酶的表达，从而增加 CO、胆绿素和继之胆红素的产生。HO-1 诱导因素的多样性是对细胞的一种重要保护机制。许多疾病均可见 HO-1 表达增加，例如肿瘤、动脉粥样硬化、心肌缺血和阿尔茨海默病等。HO 对机体的保护作用是通过其催化生成的产物来实现的，这些产物主要是 CO 与胆红素。

作为信息分子和神经递质的 CO

人们一直认为 CO 因对 Hb 有高度亲和力而呈现有害效应。近年来研究显示，低浓度 CO 在体内还发挥类似 NO 作为信息分子和神经递质的作用。血红素加氧酶催化的反应是机体内源性 CO 生成的主要反应。研究表明：CO 作为重要信息分子，主要通过激活鸟苷酸环化酶升高胞内 cGMP 含量来介导舒张血管、增加血流量及调节血压的效应。因此人们试图通过诱导血红素加氧酶的表达以期达到治疗心血管疾病的目的。CO 激活鸟苷酸环化酶产生的 cGMP，亦可抑制血小板的激活和聚集，从而发挥抗炎作用。此外，CO 还作为下丘脑中的神经递质，发挥神经内分泌调节的作用。目前，CO 作为气体信息分子所介导的诸多生物学效应正在为广大学者所关注。

胆红素过量对人体有害，但适宜水平的胆红素对人体还呈现有益的一面。胆红素是人体内强有力的内源性抗氧化剂，是血清中抗氧化活性的主要成分，可有效地清除超氧化物和过氧化物自由基。氧化应激可诱导 HO-1 的表达，从而增加胆红素的量以抵御氧化应激状态。胆红素的这种抗氧化作用通过胆绿素还原酶循环（biliverdin reductase cycle）实现：胆红素氧化成胆绿素，后者再在分布广、活性强的胆绿素还原酶催化下，利用 NADH 或

NADPH 再还原成胆红素。胆绿素还原酶循环可使胆红素的作用增大 10000 倍。

二、血液中的胆红素主要与清蛋白结合而运输

胆红素在单核吞噬系统细胞生成以后释放入血。在血浆中主要以胆红素-清蛋白复合体形式存在和运输。血浆清蛋白与胆红素的结合，一方面增加了胆红素的水溶性，提高了血浆对胆红素的运输能力；另一方面限制了它自由通透各种细胞膜，避免了其对组织细胞造成的毒性作用。研究证明，每个清蛋白分子有一个高亲和力结合部位和一个低亲和力结合部位，可结合两分子胆红素。正常人血浆胆红素含量为 3.4～17.1μmol/L（0.2～1.0mg/dl），而每 100ml 血浆清蛋白可结合 25mg 胆红素，故在正常情况下血浆清蛋白结合胆红素的潜力很大，不与清蛋白结合的胆红素甚微。但必须提及的是，胆红素与清蛋白的结合是非特异性、非共价可逆性的。若清蛋白含量明显降低、结合部位被其他物质占据或降低胆红素对结合部位的亲和力，均可促使胆红素从血浆向组织细胞转移。某些有机阴离子（如磺胺药、水杨酸、胆汁酸、脂肪酸等）可与胆红素竞争性地结合清蛋白，使胆红素游离。过多的游离胆红素则可与脑部基底核的脂类结合，干扰脑的正常功能，称为胆红素脑病（bilirubin encephalopathy）或核黄疸（kernicterus）。有黄疸倾向的病人或新生儿生理性黄疸期，应慎用上述药物。因此，血浆清蛋白与胆红素的结合仅起到暂时性的解毒作用，其根本性的解毒依赖肝与葡糖醛酸结合的生物转化作用。把这种未经肝结合转化的，在血液中与清蛋白结合运输的胆红素称为未结合胆红素（unconjugated bilirubin）或血胆红素或游离胆红素。未结合胆红素因分子内氢键存在，不能直接与重氮试剂反应，只有在加入乙醇或尿素等破坏氢键后才能与重氮试剂反应，生成紫红色偶氮化合物，故未结合胆红素又称为间接反应胆红素或间接胆红素（indirect bilirubin）。

三、胆红素在肝细胞中转变为结合胆红素并泌入胆小管

（一）游离胆红素可渗透肝细胞膜而被摄取

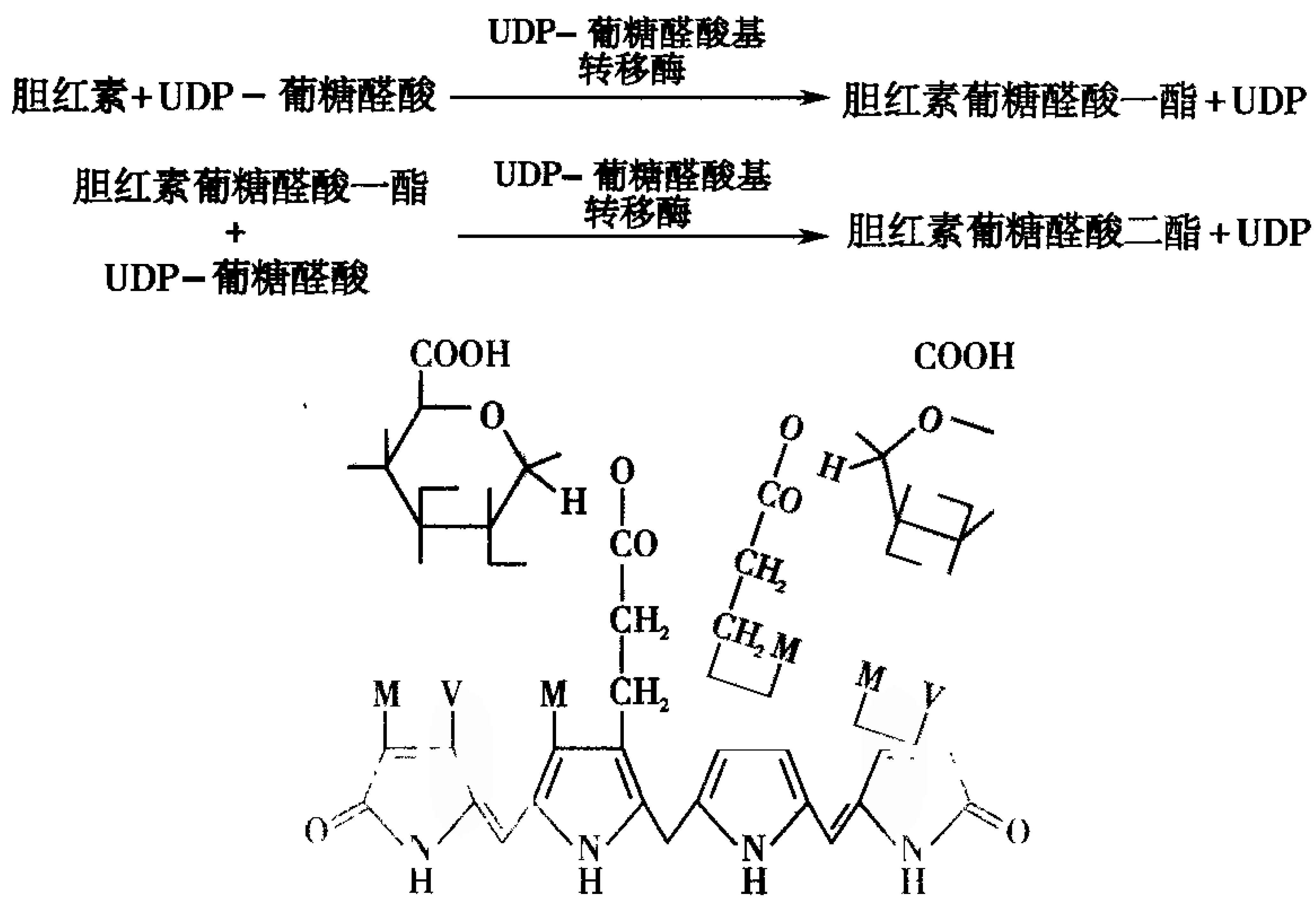
血中的胆红素以胆红素-清蛋白复合体的形式运输到肝后，在被肝细胞摄取前先与清蛋白分离，然后迅速被肝细胞摄取。胆红素可以自由双向通透肝血窦肝细胞膜表面而进入肝细胞。所以，肝细胞对胆红素的摄取量取决于肝细胞对胆红素的进一步处理能力。

胆红素进入肝细胞后，在胞质中主要与胞质 Y 蛋白和 Z 蛋白两种配体蛋白（ligandin）相结合，其中以 Y 蛋白为主。配体蛋白是胆红素在肝细胞质的主要载体，系谷胱甘肽-S-转移酶（GST）家族成员，含量丰富，约占肝细胞质总蛋白的 3%～4%，对胆红素有高亲和力。配体蛋白可与胆红素 1∶1 结合，以胆红素-Y 蛋白或胆红素-Z 蛋白形式将胆红素携带至肝细胞滑面内质网。

（二）胆红素在内质网结合葡糖醛酸生成水溶性结合胆红素

在滑面内质网 UDP-葡糖醛酸基转移酶（UDP glucuronyl transferase，UGT）的催化下，由 UDP-葡糖醛酸提供葡糖醛酸基，胆红素分子的丙酸基与葡糖醛酸以酯键结合，生成葡糖醛酸胆红素（bilirubin glucuronide）。由于胆红素分子中含有 2 个羧基，每分子胆红素可至多结合 2 分子葡糖醛酸。结果主要生成胆红素葡糖醛酸二酯和少量胆红素葡糖醛酸一酯（图 17-6），两者均可被分泌入胆汁。此外，尚有少量胆红素与硫酸结合，生成硫酸酯。胆红素与葡糖醛酸的结合是肝对有毒性胆红素一种根本性的生物转化解毒方式。把这些在肝与葡糖醛酸结合转化的胆红素称为结合胆红素（conjugated bilirubin）或肝胆红素。与葡糖醛酸结合的胆红素因分子内不再有氢键，分子中间的甲烯桥不再深埋于分子内

部，可以迅速、直接与重氮试剂发生反应，故结合胆红素又称为直接反应胆红素或直接胆红素（direct bilirubin）。结合胆红素与未结合胆红素不同理化性质的比较见表 17-5。



●图 17-6　葡糖醛酸胆红素的生成及其结构

M：$-CH_3$；V：$-CH=CH_2$

表 17-5　两种胆红素理化性质的比较

理化性质	未结合胆红素	结合胆红素
同义名称	间接胆红素、游离胆红素、血胆红素、肝前胆红素	直接胆红素、肝胆红素
与葡糖醛酸结合	未结合	结合
水溶性	小	大
脂溶性	大	小
透过细胞膜的能力及毒性	大	小
能否透过肾小球随尿排出	不能	能
与重氮试剂反应*	间接阳性	直接阳性

* 重氮试剂反应又称凡登白反应（van den Bergh's test），临床检验已停止使用

UDP-葡糖醛酸基转移酶是诱导酶，可被许多药物如苯巴比妥等诱导，从而加强胆红素的代谢。因此，临床上可应用苯巴比妥消除新生儿生理性黄疸。

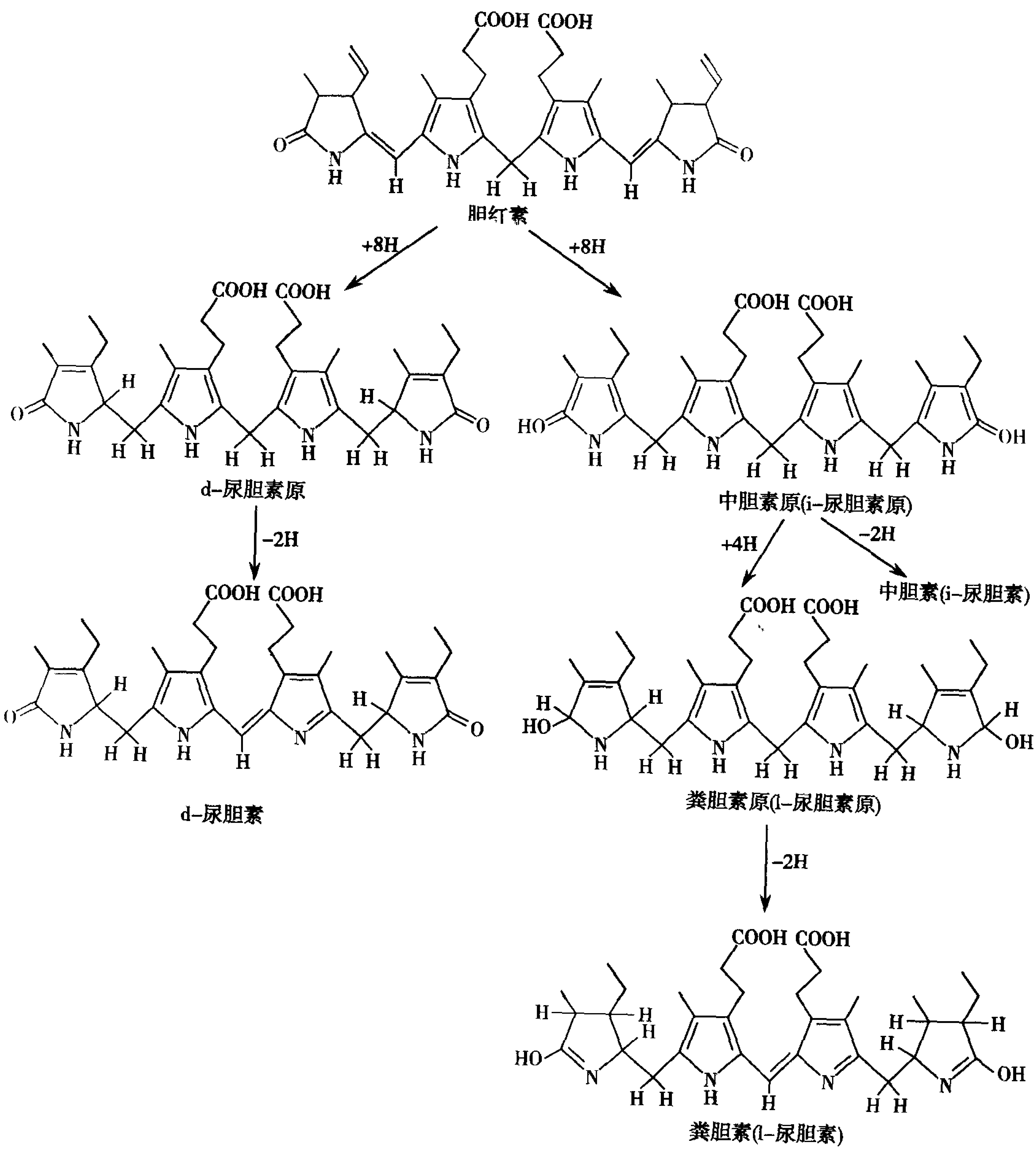
（三）肝细胞向胆小管分泌结合胆红素

结合胆红素水溶性强，被肝细胞分泌进入胆管系统，随胆汁排入小肠。此被认为是肝代谢胆红素的限速步骤，亦是肝处理胆红素的薄弱环节。肝细胞向胆小管分泌结合胆红素是一个逆浓度梯度的主动转运过程，定位于肝细胞膜胆小管域的多耐药相关蛋白 2（multidrug resistance-like protein 2，MRP2）是肝细胞向胆小管分泌结合胆红素的转运蛋白。胆红素排泄一旦发生障碍，结合胆红素就可返流入血。对 UDP-葡糖醛酸基转移酶具有诱导作用的苯巴比妥等药物对结合胆红素从肝细胞到胆汁的分泌也同样具有诱导作用，可见胆红素的结合转化与分泌构成相互协调的功能体系。血浆中的胆红素通过肝细胞膜的自由扩散、肝细胞质内配体蛋白的运转、内质网的葡糖醛酸基转移酶的催化和肝细胞膜的主动分泌等联合作用，不断地被肝细胞摄取、结合转化与排泄，从而不断地得以清除。

四、胆红素在肠道内转化为胆素原和胆素

（一）胆素原是肠菌作用的产物

经肝细胞转化生成的葡糖醛酸胆红素随胆汁进入肠道，在回肠下段和结肠的肠菌作用下，脱去葡糖醛酸基，并被还原生成 d-尿胆素原（d-urobilinogen）和中胆素原（mesobilirubinogen，i-urobilinogen）。后者又可进一步还原生成粪胆素原（stercobilinogen，l-urobilinogen），这些物质统称为胆素原。大部分胆素原随粪便排出体外，在肠道下段，这些无色的胆素原接触空气后分别被氧化为相应的 d-尿胆素（d-urobilin）、i-尿胆素（i-urobilin）和粪胆素（stercobilin，l-urobilin），三者合称胆素（图 17-7）。胆素呈黄褐色，成为

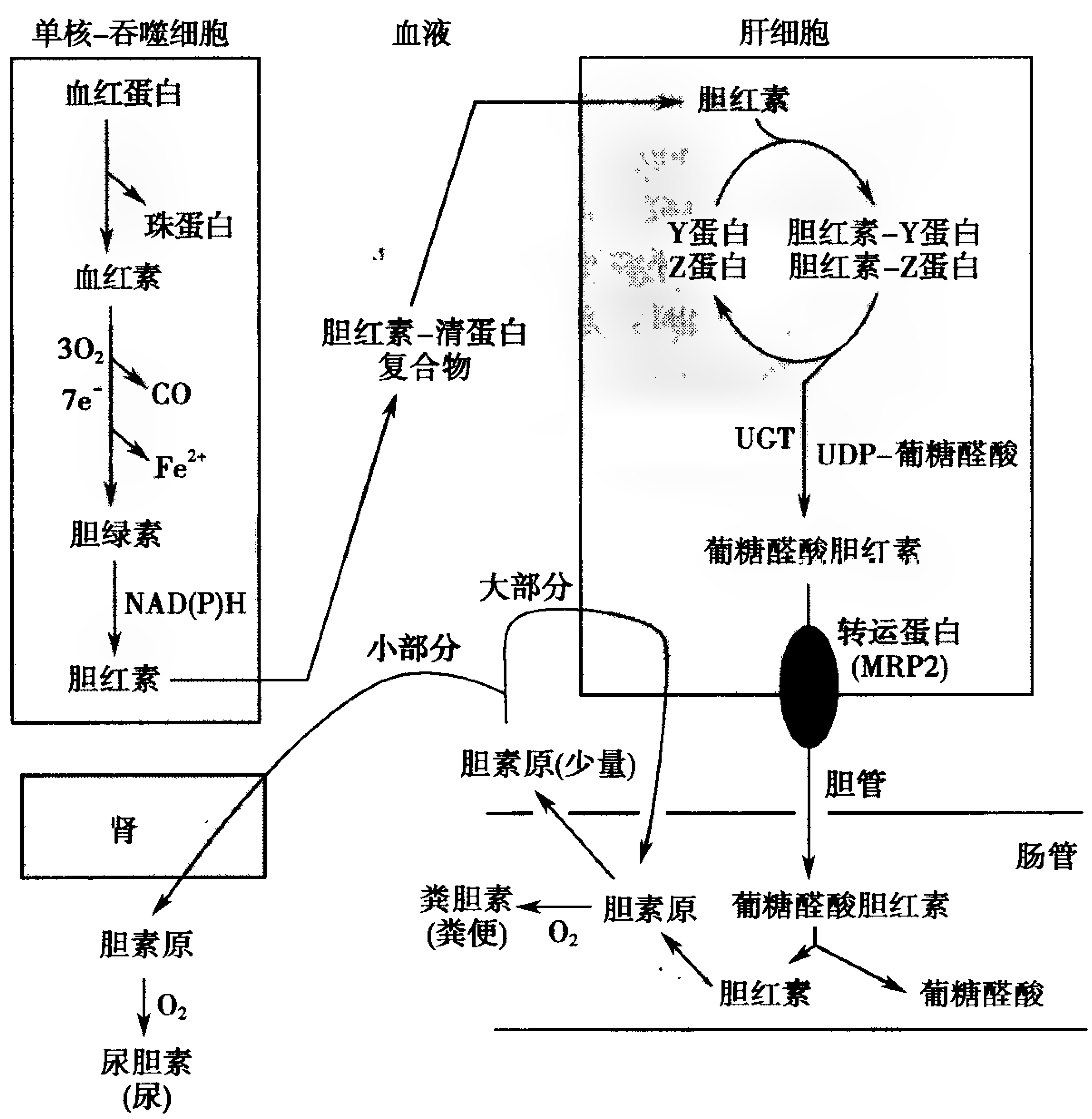


●图 17-7 粪胆素和尿胆素的生成

粪便的主要颜色。正常人每日排出总量为 40～280mg。胆道完全梗阻时，胆红素不能排入肠道形成胆素原进而形成胆素，因此粪便呈现灰白色或白陶土色。新生儿的肠道细菌稀少，粪便中未被细菌作用的胆红素使粪便呈现橘黄色。

（二）少量胆素原可被肠黏膜重吸收，进入胆素原的肠肝循环

肠道中生成的胆素原约有 10%～20%可被肠黏膜细胞重吸收，经门静脉入肝，其中大部分再次随胆汁排入肠腔，形成胆素原的肠肝循环（bilinogen enterohepatic circulation）。只有小部分胆素原进入体循环并入肾随尿排出，称为尿胆素原（图 17-8）。正常人每日随尿排出尿胆素原约 0.5～4.0mg。尿胆素原被空气氧化后生成尿胆素，成为尿的主要色素。临床上将尿胆素原、尿胆素及尿胆红素合称为尿三胆，是黄疸类型鉴别诊断的常用指标。正常人尿中检测不到尿胆红素。



●图 17-8 胆红素的生成与胆素原的肠肝循环

五、高胆红素血症及黄疸

（一）正常人胆红素的生成与排泄维持动态平衡

正常人血清胆红素总量为 3.4～17.1μmol/L（0.2～1mg/dl），其中约 80%是未结合胆红素，其余为结合胆红素。未结合胆红素是有毒的脂溶性物质，易透过细胞膜进入细胞，尤其对富含脂类的神经细胞造成不可逆地损伤。因此，肝对胆红素的解毒作用具有十分重要的意义。肝对血浆胆红素具有强大的处理能力，这不仅表现在肝具有强大的摄取能力及肝细胞内具有强大的代谢转化与排泄能力，而且还表现在肝通过生物转化作用将胆红素与葡糖醛酸结合，转变成水溶性的易于排泄的物质。虽然正常人每天从单核-吞噬细胞

系统产生 200～300mg 胆红素，但正常人肝每天可清除 3000mg 以上的胆红素，远远大于机体产生胆红素的能力，使得胆红素的生成与排泄处于动态平衡，因此正常人血清中胆红素的含量甚微。

（二）黄疸依据病因有溶血性、肝细胞性和阻塞性之分

体内胆红素生成过多，或肝细胞对胆红素的摄取、转化及排泄能力下降等因素均可引起血浆胆红素含量增多，称为高胆红素血症（hyperbilirubinemia）。胆红素为橙黄色物质，过量的胆红素可扩散进入组织造成组织黄染，这一体征称为黄疸（jaundice）。由于皮肤、巩膜等含有较多的弹性蛋白，后者对胆红素有较强的亲和力，这些组织极易黄染。黄疸的程度与血清胆红素的浓度密切相关。当血浆胆红素浓度超过 34.2μmol/L（2mg/dl）时，肉眼可见皮肤、黏膜及巩膜等组织黄染，临床上称为显性黄疸。若血浆胆红素升高不明显，在 1～2mg/dl 之间时，肉眼观察不到皮肤与巩膜等黄染现象，称为隐性黄疸（jaundice occult）。

临床上常根据黄疸发病的原因不同，简单地将黄疸分为三类：

1. 溶血性黄疸 溶血性黄疸（hemolytic jaundice），又称为肝前性黄疸（prehepatic jaundice）。属于高未结合型胆红素血症。此类黄疸是由于红细胞的大量破坏，在单核-吞噬细胞系统产生胆红素过多，超过了肝细胞摄取、转化和排泄胆红素的能力，造成血液中未结合胆红素浓度显著增高所致。此时，血浆总胆红素、未结合胆红素含量增高，结合胆红素的浓度改变不大，重氮试剂反应间接阳性，尿胆红素阴性。还由于肝对胆红素的摄取、转化和排泄增多，过多的胆红素进入胆道系统，肠肝循环增多，使得尿中尿胆原和尿胆素含量增多，粪胆原与粪胆素亦增加。某些药物、某些疾病（如恶性疟疾、过敏等）、输血不当、镰刀型红细胞贫血、葡糖-6-磷酸脱氢酶缺乏（蚕豆病）等多种因素均有可能引起大量红细胞破坏，导致溶血性黄疸。

2. 肝细胞性黄疸 肝细胞性黄疸（hepatocellular jaundice）又称为肝原性黄疸（hepatic jaundice）。由于肝细胞功能受损，造成其摄取、转化和排泄胆红素的能力降低所致的黄疸。肝细胞性黄疸时，不仅由于肝细胞摄取胆红素障碍，造成血中未结合胆红素浓度升高，临床检验结果与肝前性黄疸的临床检验结果相似。还由于肝细胞肿胀，压迫毛细胆管，造成肝内毛细胆管阻塞，而后者与肝血窦直接相通，使部分结合胆红素返流入血，造成血清结合胆红素浓度亦增高，临床检验又出现与肝后性黄疸相似的结果。因此，肝细胞性黄疸时血清重氮试剂反应呈双向阳性。由于结合胆红素能通过肾小球滤过，故尿胆红素呈现阳性。由于肝功能障碍，结合胆红素在肝内生成减少，粪便颜色可变浅。肝细胞性黄疸常见于肝实质性疾病，如各种肝炎、肝肿瘤和肝硬化等。

3. 阻塞性黄疸 阻塞性黄疸（obstructive jaundice），又称为肝后性黄疸（posthepatic jaundice）。此类黄疸是由于各种原因引起的胆管系统阻塞，胆汁排泄障碍所致。胆汁排泄障碍可使胆小管和毛细胆管内压力增高而破裂，导致结合胆红素返流入血，使得血清结合胆红素明显升高。实验室检查可发现重氮试剂反应直接阳性，血清间接胆红素可无明显变化。由于大量结合胆红素可以从肾小球滤出，所以尿胆红素呈阳性反应，尿的颜色变深，可呈茶叶水色。由于胆管阻塞排入肠道的胆红素减少，生成的胆素原也减少。完全阻塞的病人粪便因无胆色素而变成灰白色或白陶土色。阻塞性黄疸常见于胆管炎、肿瘤（尤其胰腺癌）、胆结石或先天性胆管闭锁等疾病。

各种黄疸血、尿、粪胆色素的实验室检查变化见表 17-6。

表 17-6　各种黄疸血、尿、粪胆色素的实验室检查变化

指　标	正　常	溶血性黄疸	肝细胞性黄疸	阻塞性黄疸
血清胆红素				
浓度	<1mg/dl	>1mg/dl	>1mg/dl	>1mg/dl
结合胆红素	极少		↑	↑↑
未结合胆红素	0～0.7mg/dl	↑↑	↑	
尿三胆				
尿胆红素	－		＋＋	＋＋
尿胆素原	少量	↑	不一定	↓
尿胆素	少量	↑	不一定	↓
粪胆素原	40～280mg/24h	↑	↓或正常	↓或－
粪便颜色	正常	深	变浅或正常	完全阻塞时白陶土色

小　结

独特的组织结构和化学组成特点，赋予了肝复杂多样的生物化学功能。肝不仅是多种物质代谢的中枢，而且还具有生物转化、分泌和排泄等功能。

肝通过肝糖原合成与分解、糖异生维持血糖的相对稳定。肝在脂类代谢中占据中心地位。肝将胆固醇转化为胆汁酸，协助脂类的消化与吸收。肝是体内合成甘油三酯、磷脂与胆固醇的重要器官。肝能合成 VLDL 及 HDL，参与甘油三酯与胆固醇的转运。LCAT 是肝合成的血浆功能性酶，参与血浆胆固醇的酯化。肝是氧化脂肪酸并产生酮体的器官。肝的蛋白质合成与分解代谢均非常活跃。除 γ-球蛋白外，几乎所有的血浆蛋白质均来自肝。肝是除支链氨基酸外所有氨基酸分解代谢的重要器官，也是处理氨基酸分解代谢产物的重要场所。氨主要在肝内经鸟氨酸循环合成尿素而解毒。肝在维生素的吸收、储存、运输和代谢转化方面起重要作用。肝也是许多激素灭活的场所。

肝通过生物转化对内、外源性非营养物质进行化学改造，提高其水溶性和极性，利于从尿液或胆汁排出。肝生物转化分为两相反应：第一相反应包括氧化、还原和水解；第二相反应是结合反应，主要与葡糖醛酸、硫酸和乙酰基等结合。肝生物转化受年龄、性别、营养、疾病、遗传以及异源物诱导等因素影响，并具有转化反应的连续性、反应类型的多样性和解毒与致毒的双重性特点。

胆汁是肝细胞分泌的兼具消化液和排泄液的液体。作为胆汁主要成分的胆汁酸是胆固醇的代谢产物，是肝清除体内胆固醇的主要形式。胆固醇 7α-羟化酶是胆汁酸合成的限速酶，与胆固醇合成的限速酶 HMG-CoA 还原酶一同受胆汁酸和胆固醇的调节。胆汁酸有初级胆汁酸与次级胆汁酸之分。初级胆汁酸合成于肝，包括胆酸与鹅脱氧胆酸。初级胆汁酸经肠菌作用生成次级胆汁酸，包括脱氧胆酸与石胆酸。胆汁酸还有游离型胆汁酸与结合型胆汁酸之分。结合型胆汁酸是游离胆汁酸与甘氨酸或牛磺酸在肝内结合的产物。胆汁酸的肠肝循环使有限的胆汁酸库存反复利用以满足脂类消化、吸收的需要。

胆色素是铁卟啉类化合物的主要分解代谢产物。胆红素主要来源于衰老红细胞内血红素的降解。血红素加氧酶（HO）和胆绿素还原酶催化血红素经胆绿素生成胆红素。HO-1 是诱导酶，受血红素和氧化应激等多种因素的诱导合成。反应伴生的 CO 则可作为信息分子，激活鸟苷酸环化酶而介导诸多生物学效应。胆红素为脂溶性，在血液中与清蛋白结合（游离胆红素）而运输。在肝细胞胆红素与葡糖醛酸结合生成水溶性的胆红素（结合胆红素），后者由肝主动分泌，经胆管排入小肠。在肠菌作用下，胆红素被还原成胆素原。胆

素原的大部分在肠道下段接触空气被氧化为黄褐色的胆素。约10%～20%的胆素原被肠黏膜重吸收入肝，其中的大部分又以原形重新排入肠道，构成胆素原的肠肝循环，另一小部分则经肾排入尿中。胆素原和胆素分别是几种胆素原和胆素的总称。正常人血清胆红素含量甚微。任何原因引起胆红素生成过多和（或）肝摄取、转化、排泄胆红素过程发生障碍均可致高胆红素血症。大量的胆红素可扩散进入组织造成黄染，此称黄疸。根据黄疸发生的原因可将黄疸分为溶血性黄疸、肝细胞性黄疸和阻塞性黄疸。各种黄疸均有其独特的血、尿、粪胆色素实验室检查改变。

（王明臣）

第十八章 维生素与无机物

维生素（vitamin）是维持人体正常生理功能所必需的营养素，是人体内不能合成或合成量甚少，必须由食物供给的一组低分子有机化合物。维生素既不构成机体组织的组成成分，也不是供能物质，然而在调节人体物质代谢和维持正常生理功能等方面却发挥着极其重要的作用。维生素是结构上互不相关的一组有机化合物，按其溶解性不同，可分为脂溶性维生素（lipid-soluble vitamin）和水溶性维生素（water-soluble vitamin）两大类。

无机元素对于维持人体正常生理功能也必不可少，按人体每日需要量的多寡可分为常量元素（macroelement）和微量元素（trace element，microelement）。微量元素指人体每日需要量在100mg以下的化学元素，主要包括铁、碘、铜、锌、锰、硒、氟、钼、钴、铬等。常量元素主要有钠、钾、氯、钙、磷、镁等。钠、钾、氯的代谢将在病理生理学中详尽讨论，本章不予描述。

长期缺乏维生素和无机元素均可导致相应的缺乏症。

第一节 脂溶性维生素

脂溶性维生素是疏水性化合物，包括维生素A、D、E和K。脂溶性维生素的作用多种多样，除了直接参与影响特异的代谢过程外，它们多半还与细胞内核受体结合，影响特定基因的表达。脂溶性维生素常随脂类物质吸收，在血液中与脂蛋白或特异的结合蛋白相结合而运输，并在体内常有一定的储量。脂类吸收障碍和食物中长期缺乏此类维生素可引起相应的缺乏症，摄入过多可发生中毒。

一、维生素A又称抗干眼病维生素

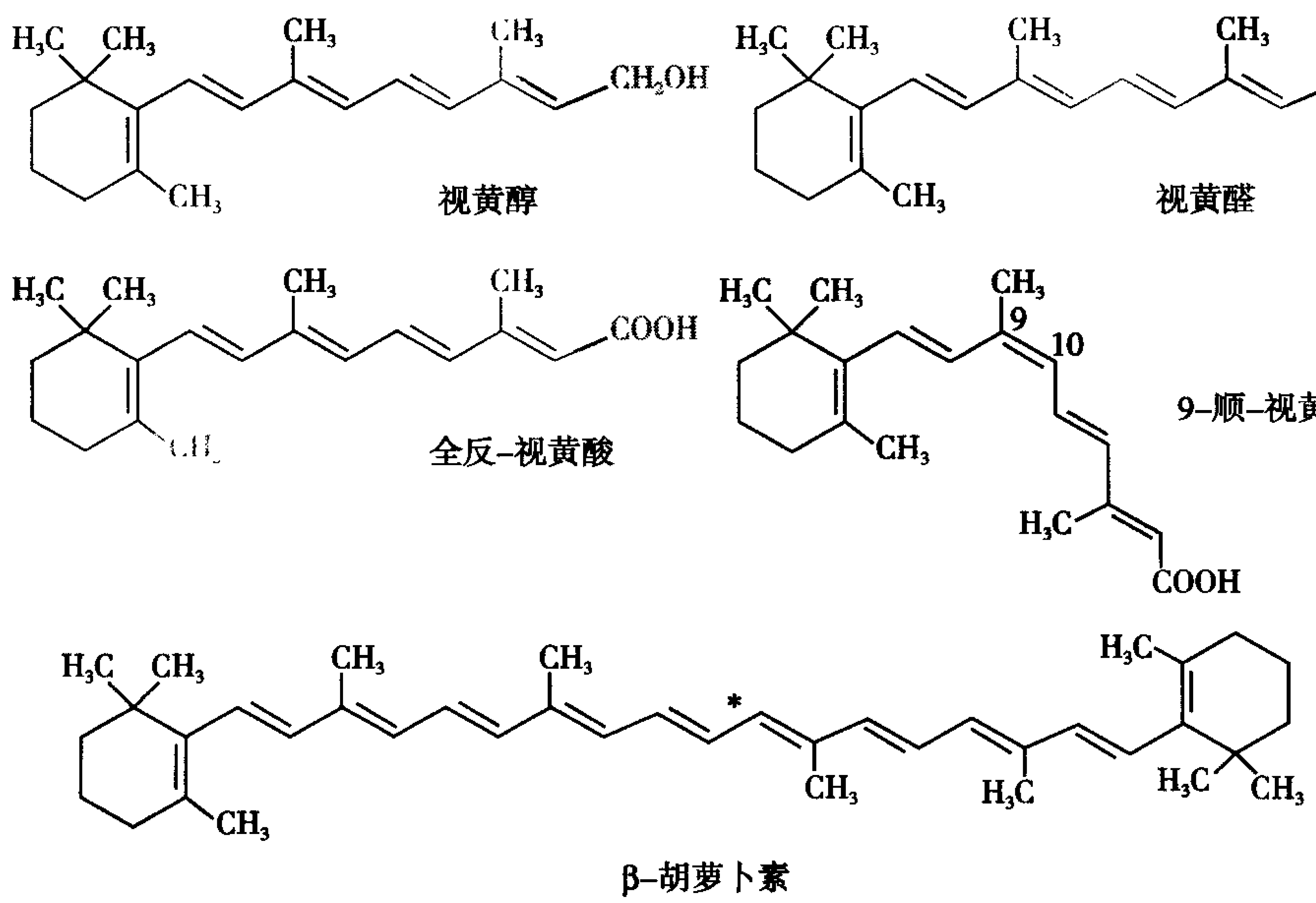
（一）视黄醇与其特异的结合蛋白相结合而在血液中运输

维生素A是由β-白芷酮环和两分子异戊二烯构成的多烯化合物，天然维生素A有A_1，即视黄醇（retinol）和A_2（3-脱氢视黄醇）。动物性食品，如肝、肉类、蛋黄、乳制品、鱼肝油是维生素A的丰富来源。动物食品中的维生素A主要以酯的形式存在，在小肠内酶解生成游离的视黄醇。植物中不存在维生素A，但含有称作维生素A原（provitamin A）的多种胡萝卜素（carotene），其中以β-胡萝卜素最为重要。胡萝卜素使蔬菜、水果、花卉呈现红色、橙色、黄色和紫色。小肠黏膜细胞中胡萝卜素加双氧酶可催化β-胡萝卜素加氧分解生成2分子视黄醇。由于小肠黏膜对β-胡萝卜素分解与吸收的能力有限，每6分子β-胡萝卜素可获得1分子视黄醇。视黄醇在小肠黏膜上皮细胞内重新酯化并主要参加乳糜微粒的生成。

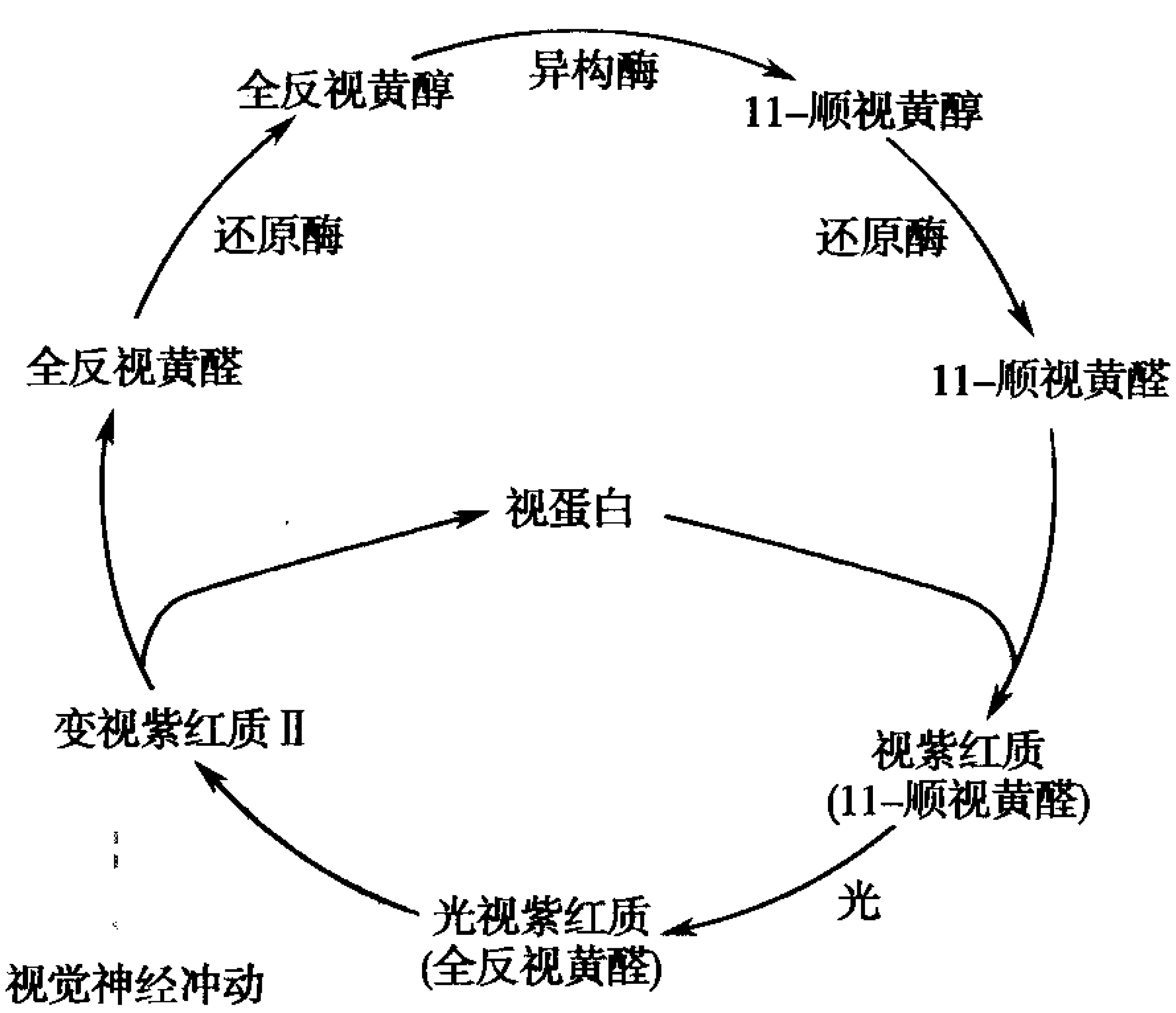
乳糜微粒中的视黄醇酯被肝细胞和其他组织摄取。视黄醇酯在肝细胞中水解游离出视黄醇。一部分视黄醇与视黄醇结合蛋白（retinol binding protein，RBP）相结合并分泌入血。在血液中，约95％的RBP再与运甲腺蛋白（transthyretin，TTR）相结合。在靶组织，视黄醇与细胞表面特异受体结合并被摄取利用。在细胞内，视黄醇与细胞视黄醇结合蛋白（cellular retinal binding protein，CRBP）结合。肝细胞内过多的视黄醇则转移到肝内星形细胞（stellate cell），再以视黄醇酯的形式储存，其储量可达体内总视黄醇的50％～80％，高达100mg。

(二) 视黄醇、视黄醛和视黄酸是维生素 A 的活性形式

在细胞内一些依赖 NADH 的醇脱氢酶催化视黄醇和视黄醛（retinal）之间的可逆反应。视黄醛在视黄醛脱氢酶的催化下又不可逆的氧化生成视黄酸（retinoic acid）。视黄醇、视黄醛和视黄酸是维生素 A 的活性形式（图 18-1）。



●图 18-1 维生素 A 与 β-胡萝卜素的结构式



●图 18-2 视循环

全反式视黄醇在异构酶的作用下生成 11-顺视黄醇，后者在还原酶的催化下生成 11-顺视黄醛。11-顺视黄醛与视蛋白结合生成视紫红质。弱光可使视紫红质中 11 顺视黄醛和视蛋白分别发生构型和构象改变，生成含全反视黄醛的光视紫红质。光视紫红质（photorhodopsin）再经一系列构象变化，生成变视紫红质Ⅱ（metarhodopsin Ⅱ），后者引起视觉神经冲动并随之水解释放全反视黄醛和视蛋白。全反视黄醛经还原生成全反视黄醇，从而完成视循环

1. 视黄醛与视蛋白结合发挥其视觉功能 在感受弱光或暗光的人视网膜杆状细胞内，全反式视黄醇被异构成 11-顺视黄醇，并进而氧化为 11-顺视黄醛。11-顺视黄醛作为光敏感视蛋白（opsin）的辅基与之结合生成视紫红质（rhodopsin）。当视紫红质感光时，11-顺视黄醛迅速地光异构为全反式视黄醛，并引起视蛋白发生变构。视蛋白是 G 蛋白偶联跨膜受体，通过一系列反应产生视觉神经冲动。此后，视紫红质被分解，全反式视黄醛和视蛋白分离，从而构成视循环（图 18-2）。

维生素 A 缺乏时，视循环的关键物质 11-顺视黄醛的补充不足，视紫红质合成减少，对弱光敏感性降低，暗适应时间延长，严重时会发生“夜盲症”。

2. 视黄酸对基因表达和组织分化具有调节作用 维生素 A 的另一重要作用是调控细胞的生长与分化。全反式视黄酸和 9-顺视黄酸是执行这一重要功能的关键物质。他们结合细胞内核受体，与 DNA 反应元件结合，调节某些基因的表达。视黄酸对于维持上皮组织的正常形态与生长具有重要的作用。维生素 A 缺乏可引起严重的上皮角化，眼结膜黏液分泌细胞的丢失与角化以

及糖蛋白分泌的减少均可引起角膜干燥，出现干眼病（xerophthalmia）。因此，维生素A又称抗干眼病维生素。

视黄酸对于免疫系统细胞的分化具有重要的作用。维生素A缺乏增加机体对感染性疾病的敏感性。视黄酸具有抗癌作用已为人们所熟知。动物实验表明摄入维生素A可诱导细胞分化和减轻致癌物质的作用。

3. 维生素A和胡萝卜素是有效的抗氧化剂　维生素A和胡萝卜素在氧分压较低的条件下，能直接消灭自由基，有助于控制细胞膜和富含脂质组织的脂质过氧化。

4. 维生素A过量可引起中毒　维生素A的摄入量超过视黄醇结合蛋白的结合能力，游离的维生素A可造成组织损伤。一次服用200mg视黄醇或视黄醛，或每日服用40mg维生素A多日均可出现维生素A中毒表现。其症状主要有头痛、恶心、共济失调等中枢神经系统表现；肝细胞损伤和高脂血症；长骨增厚、高钙血症、软组织钙化等钙稳态失调表现以及皮肤干燥、脱屑和脱发等皮肤表现。

二、维生素D可在体内合成

（一）维生素D的活化形式是1,25-二羟维生素D

维生素D是类固醇衍生物。鱼油、蛋黄、肝富含维生素D_3（胆钙化醇cholecalciferol）；植物中含有维生素D_2（麦角钙化醇ergocalciferol）。

人体皮下储存有从胆固醇生成的7-脱氢胆固醇，即维生素D_3原，在紫外线的照射下，可转变成维生素D_3。适当的日光浴足以满足人体对维生素D的需要。

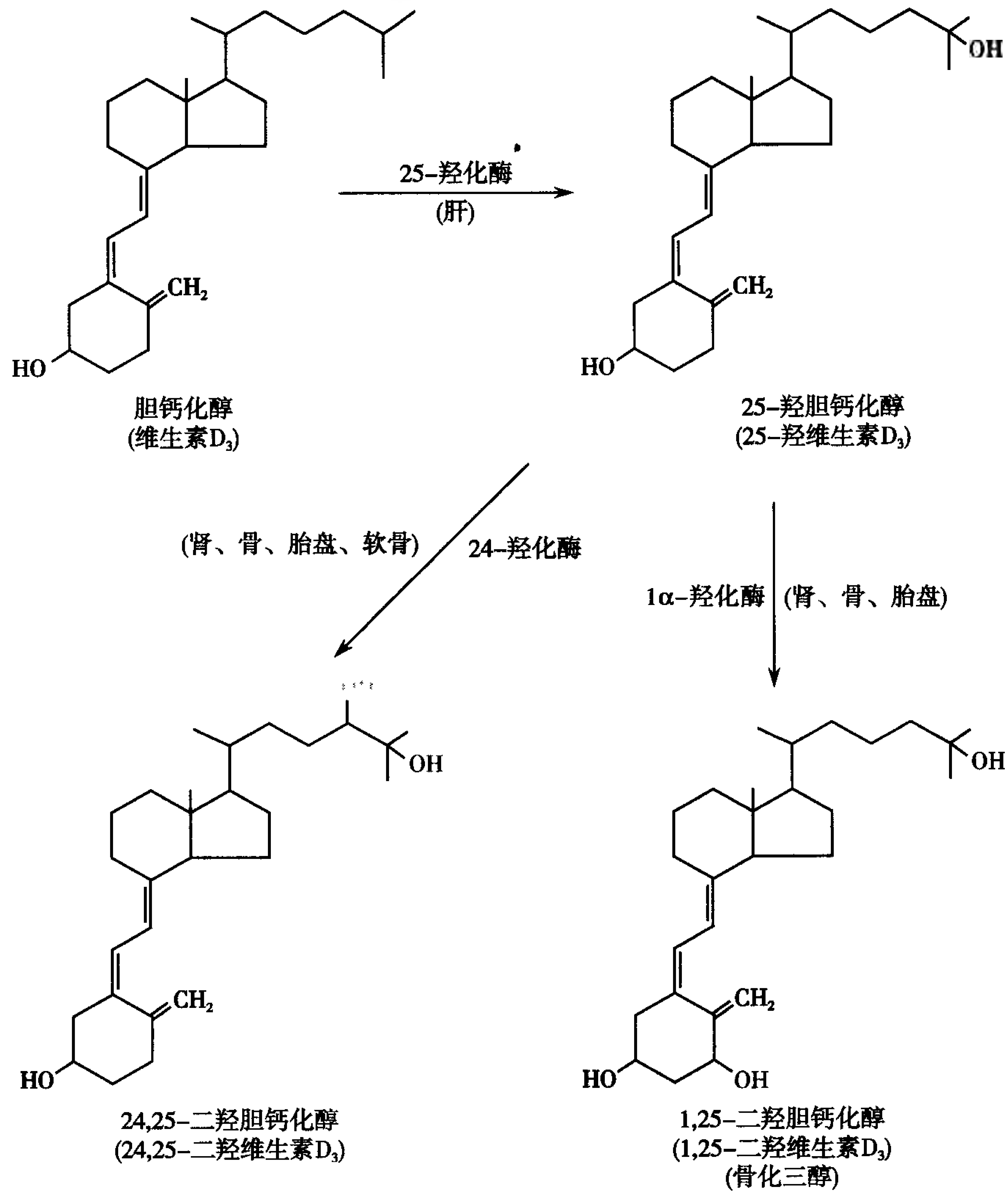
进入血液的维生素D_3主要与血浆中一种特异载体蛋白，即维生素D结合蛋白（vitamin D binding protein，DBP）相结合而运输。在肝微粒体25-羟化酶的催化下，维生素D_3被羟化生成25-羟维生素D_3（25-OH-D_3）。25-OH-D_3是血浆中维生素D_3的主要存在形式，也是维生素D_3在肝中的主要储存形式。25-OH-D_3在肾小管上皮细胞线粒体1α-羟化酶的作用下，生成维生素D_3的活性形式1,25-二羟维生素D_3［1,25-$(OH)_2D_3$］。1,25-$(OH)_2D_3$作为激素，经血液运输至靶细胞发挥其对钙磷代谢的调节作用。25-OH-D_3和1,25-$(OH)_2D_3$在血液中均与DBP结合而运输。

肾小管上皮细胞还存在24-羟化酶，催化25-OH-D_3进一步羟化生成无活性的24,25-$(OH)_2D_3$。1,25-$(OH)_2D_3$通过诱导24-羟化酶和阻遏1α-羟化酶的生物合成来控制其自身的生成量（图18-3）。

（二）1,25-$(OH)_2D_3$具有调节血钙和组织细胞分化的功能

1. 调节血钙水平是1,25-$(OH)_2D_3$的重要作用　1,25-$(OH)_2D_3$与其他类固醇激素相似，在靶细胞内与特异的核受体结合，进入细胞核，调节相关基因（如钙结合蛋白、骨钙蛋白基因等）的表达。1,25-$(OH)_2D_3$还可通过信号转导系统使钙通道开放，发挥其对钙磷代谢的快速调节作用。1,25-$(OH)_2D_3$促进小肠对钙、磷的吸收，影响骨组织的钙代谢，从而维持血钙和血磷的正常水平，促进骨和牙的钙化。当缺乏维生素D时，儿童可患佝偻病（rickets），成人可发生软骨病（osteomalacia）。因此，维生素D又称抗佝偻病维生素。

2. 1,25-$(OH)_2D_3$还具有影响细胞分化的功能　大量研究证明，肾外组织细胞也具有羟化25-OH-D_3生成1,25-$(OH)_2D_3$的能力。皮肤、大肠、前列腺、乳腺、心、脑、骨骼肌、胰岛β细胞、单核细胞和活化的T和B淋巴细胞等均存在维生素D受体。1,25-$(OH)_2D_3$具有调节这些组织细胞分化等功能。已知，维生素D缺乏可引起自身免疫性疾病。1,25-$(OH)_2D_3$促进胰岛β细胞合成与分泌胰岛素，具有对抗1型和2型糖尿病的作用。1,25-$(OH)_2D_3$对某些肿瘤细胞还具有抑制增殖和促进分化的作用。低日照与大肠癌



●图 18-3 胆钙化醇的代谢

和乳腺癌的高发病率和死亡率有一定的相关性。

3. 维生素 D 过量可引起中毒 过量的服用维生素 D 可引起中毒，主要表现为高钙血症、高钙尿症、高血压以及软组织钙化。由于皮肤储存 7-脱氢胆固醇有限，多晒太阳不会引起维生素 D 中毒。

三、维生素 E 是体内最重要的脂溶性抗氧化物质

(一) 维生素 E 是生育酚类化合物

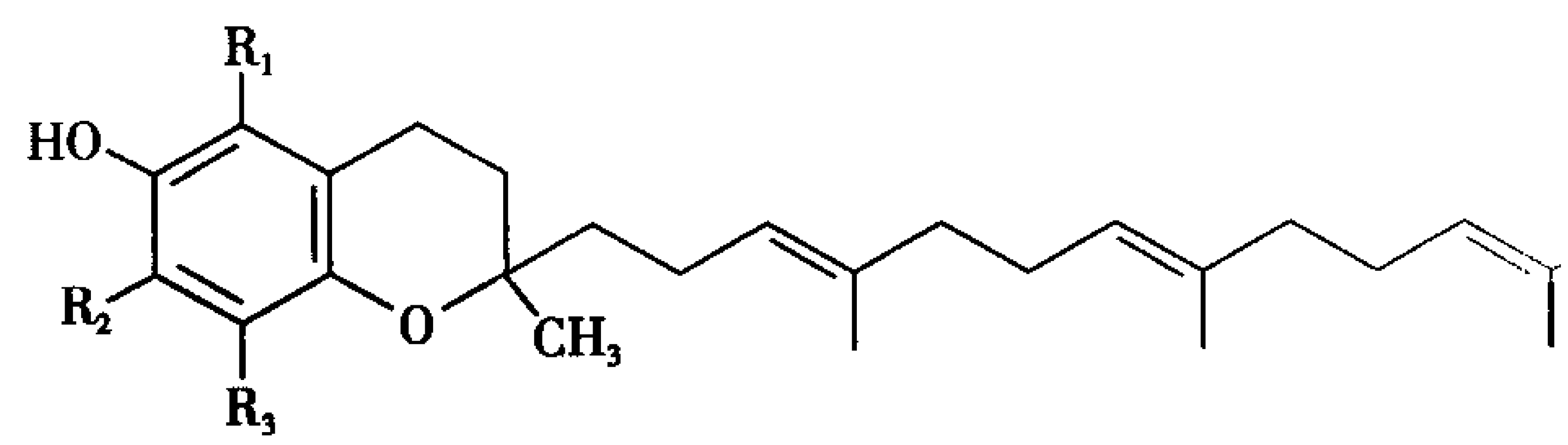
维生素 E 是苯骈二氢吡喃的衍生物，包括生育酚(tocopherol)和生育三烯酚(tocotrienol)两类(图 18-4)。每类又分 α、β、γ 和 δ 四种。自然界以 α-生育酚分布最广，活性最高。维生素 E 主要存在于植物油、油性种子和麦芽等。在正常情况下，约 20%～40%的 α-生育酚可被小肠吸收。在机体内，维生素 E 主要存在于细胞膜、血浆脂蛋白和脂库中。

(二) 维生素 E 具有抗氧化等多方面的功能

1. 维生素 E 是体内最重要的脂溶性抗氧化剂 维生素 E 作为脂溶性抗氧化剂和自由



生育酚



生育三烯酚

●图 18-4 维生素 E 的结构式

基清除剂，主要对抗生物膜上脂质过氧化所产生的自由基，保护生物膜的结构与功能。维生素 E 捕捉过氧化脂质自由基，形成反应性较低且相对稳定的生育酚自由基，后者可在维生素 C 或谷胱甘肽的作用下，还原生成非自由基产物——生育醌。维生素 E 对细胞膜的保护作用使细胞维持正常的流动性。早产的新生儿由于组织维生素 E 的储备较少和小肠吸收能力较差，可因维生素 E 缺乏引起轻度溶血性贫血。

2. 维生素 E 具有调节基因表达的作用 维生素 E 除具有强的抗氧化剂作用外，还具有调节信号转导过程和基因表达的重要作用。维生素 E 可以上调或下调生育酚的摄取和降解相关的基因、脂类摄取与动脉硬化的相关基因、表达某些细胞外基质蛋白的基因、细胞黏附与炎症的相关基因以及细胞信号系统和细胞周期调节的相关基因等。因而，维生素 E 具有抗炎、维持正常免疫功能和抑制细胞增殖的作用，并可降低血浆低密度脂蛋白（LDL）的浓度。维生素 E 在预防和治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病、肿瘤和延缓衰老方面具有一定的作用。

3. 维生素 E 能提高血红素合成的关键酶 δ-氨基-γ-酮戊酸（ALA）合酶和 ALA 脱水酶的活性，促进血红素的合成。新生儿缺维生素 E 可引起贫血。

4. 维生素 E 缺乏并不多见 维生素 E 一般不易缺乏，在严重的脂类吸收障碍和肝严重损伤时可引起缺乏症，表现为红细胞数量减少，脆性增加等溶血性贫血症。偶尔也可引起神经障碍。动物缺乏维生素 E 时其生殖器官发育受损，甚至不育。人类尚未发现因维生素 E 缺乏所致的不孕症。临床上常用维生素 E 治疗先兆流产及习惯性流产。

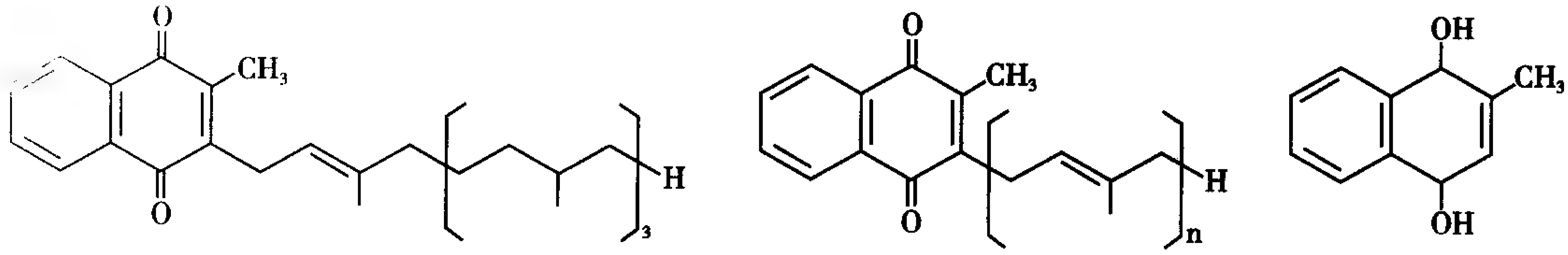
与维生素 A 和 D 不同，人类尚未发现维生素 E 中毒症，即使一次服用高出常用量 50 倍的剂量，也尚未见到中毒现象。

四、维生素 K 又称凝血维生素

（一）维生素 K 是 2-甲基-1,4-萘醌的衍生物

维生素 K 均是 2-甲基 1,4-萘醌的衍生物。广泛存在于自然界的维生素 K 有 K_1 和 K_2。维生素 K_1 又称植物甲萘醌或叶绿醌（phylloquinone），主要存在于深绿色蔬菜（如甘蓝、菠菜、莴苣等）和植物油中。维生素 K_2 是肠道细菌的产物。维生素 K_3 是人工合成的水溶性甲萘醌（图 18-5），可口服及注射。

维生素 K 主要在小肠被吸收，随乳糜微粒而代谢。体内维生素 K 的储存量有限，脂类吸收障碍引发的首个脂溶性维生素缺乏症便是维生素 K 缺乏症。



维生素K_1
(植物甲萘醌)
(叶绿醌)

维生素K_2

维生素K_3

●图 18-5 维生素 K 的结构式

(二）维生素 K 是多种 γ-谷氨酰羧化酶的辅酶

1. 维生素 K 具有促进凝血作用 维生素 K 是许多 γ 谷氨酰羧化酶的辅酶。血液凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ及抗凝血因子蛋白 C 和蛋白 S 在肝中初合成时是无活性的前体。这些前体从无活性向活性的转变需要其分子中 4～6 个谷氨酸残基在 γ-羧化酶的催化下进行羧化，生成 γ-羧基谷氨酸（Gla）残基。Gla 具有很强的螯合 Ca^{2+} 的能力。

2. 维生素 K 对骨代谢具有重要作用 维生素 K 依赖蛋白不仅存在于肝中，还存在于各种组织中。已知，骨中骨钙蛋白（osteocalcin）和骨基质 Gla 蛋白均是维生素 K 依赖蛋白。研究表明，服用低剂量维生素 K 的妇女，其股骨颈和脊柱的骨盐密度明显低于服用大剂量维生素 K 时的骨盐密度。

此外，维生素 K 对减少动脉钙化也具有重要的作用。大剂量的维生素 K 可以降低动脉硬化的危险性。

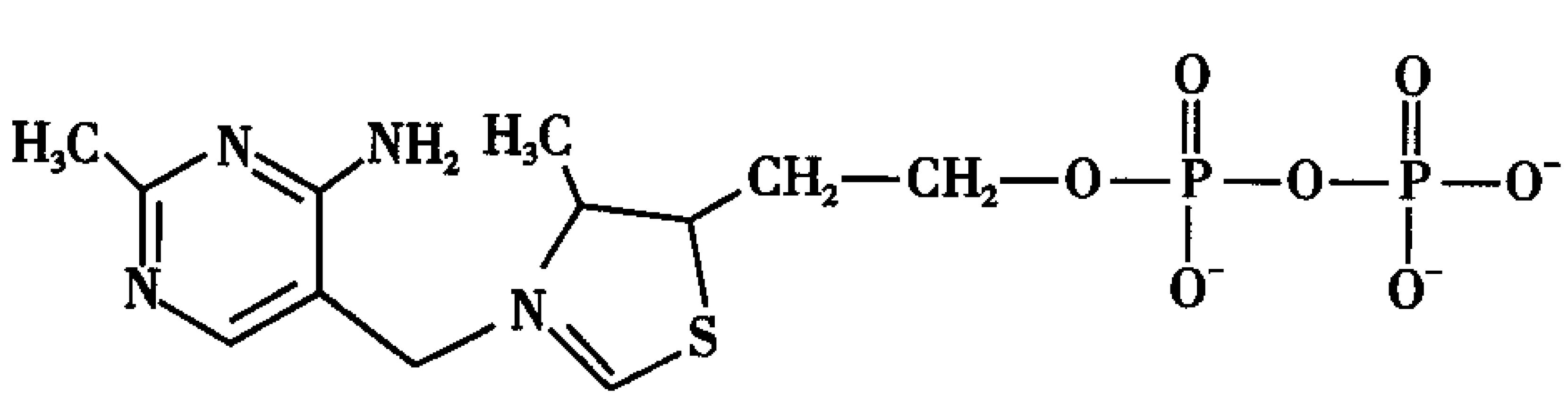
3. 维生素 K 缺乏可引起出血 成人每日对维生素 K 的需要量为 60～80μg，因维生素 K 广泛分布于动、植物组织，且体内肠菌也能合成，一般不易缺乏。因维生素 K 不能通过胎盘，新生儿出生后肠道内又无细菌，所以新生儿有可能引起维生素 K 的缺乏。维生素 K 缺乏的主要症状是易出血。引发脂类吸收障碍的疾病，如胰腺疾病、胆管疾病及小肠黏膜萎缩或脂肪便等均可出现维生素 K 缺乏症。长期应用抗生素及肠道灭菌药也有引起维生素 K 缺乏的可能性。

第二节 水溶性维生素

水溶性维生素包括 B 族维生素和维生素 C。水溶性维生素的作用比较单一，它们主要构成酶的辅助因子直接影响某些酶的催化作用。体内过剩的水溶性维生素可随尿排出体外，体内很少蓄积，一般不发生中毒现象。正因为水溶性维生素在体内的储存很少，所以必须经常从食物中摄取。

一、维生素 B_1 形成辅酶焦磷酸硫胺素

（一）焦磷酸硫胺素是维生素 B_1 的活性形式



●图 18-6 焦磷酸硫胺素的结构式

维生素 B_1 又名硫胺素（thiamine），主要存在于酵母、瘦肉、豆类和种子外皮（如米糠）及胚芽中。硫胺素易被小肠吸收，入血后主要在肝及脑组织中经硫胺素焦磷酸激酶的催化生成焦磷酸硫胺素（thiamine pyrophosphate，TPP）（图 18-6）。TPP 是维生素 B_1 的活化形式，占体内硫胺素总量的 80%。

(二) 维生素 B_1 在糖代谢中具有重要作用，缺乏可引起脚气病

维生素 B_1 在体内供能代谢中具有重要的地位。TPP 是 α-酮酸氧化脱羧酶多酶复合物的辅酶，参与线粒体内丙酮酸、α-酮戊二酸和支链氨基酸的 α-酮酸的氧化脱羧反应。TPP 在这些反应中转移醛基。TTP 噻唑环上硫和氮原子之间的碳原子十分活泼，易释放 H^+ 形成负碳离子（carbanion）。负碳离子可与 α-酮酸羧基结合，进而使 α 酮酸脱羧。TPP 也是胞液磷酸戊糖途径中转酮酶的辅酶，参与转糖醛基反应。

维生素 B_1 缺乏时，代谢中间产物丙酮酸的氧化脱羧反应发生障碍，血中丙酮酸和乳酸堆积。此时由于以糖有氧分解供能为主的神经组织供能不足以及神经细胞膜髓鞘磷脂合成受阻，导致慢性末梢神经炎和其他神经肌肉变性病变，即脚气病（beriberi）。严重者可发生浮肿、心力衰竭。

维生素 B_1 在神经传导中起一定作用。合成乙酰胆碱所需的乙酰辅酶 A 主要来自于丙酮酸的氧化脱羧反应。维生素 B_1 缺乏时，乙酰辅酶 A 的生成减少，影响乙酰胆碱的合成。同时，由于维生素 B_1 对胆碱酯酶的抑制减弱，乙酰胆碱分解加强，影响神经传导。主要表现为消化液分泌减少，胃蠕动变慢，食欲不振，消化不良等。

维生素 B_1 缺乏多见于酒精中毒者，这是由于慢性酒精中毒影响其他食物摄入时也可发生维生素 B_1 缺乏。

维生素 B_1 的发现

荷兰医生 C. Eijkman 是第一位用现代实验方法研究维生素的人。19 世纪东南亚各国流行脚气病。荷兰政府认为脚气病是细菌引起的，于是派出一个调查团前往爪哇。Eijkman 参加了这一工作。他在偶然的实验中发现，实验室里的鸡患了一种奇怪的病，从走路不稳开始，身体自下而上发生麻痹，如不进行特殊治疗则会很快死亡。鸡病的这种神经变化与脚气病相似。Eijkman 发现，鸡的这种病与鸡患病前把带有外壳的粗谷饲料更换成煮沸的精米有关。患鸡可以通过在饲料中加入谷糠予以治疗。他指出，糙米的米皮中含有一种保护素（即维生素 B_1）。他提倡人们吃粗米、喝米糠水来防治脚气病。Eijkman 虽然没有提出此保护素的确切结构，但他却是最先发现食物中含有生命必需的微量物质的人，为后来研究维生素的营养学奠定了基础。Eijkman 荣获了 1929 年的诺贝尔生理医学奖。

二、维生素 B_2 是 FAD 和 FMN 的组成成分

(一) FAD 和 FMN 是维生素 B_2 的活性形式

维生素 B_2 又名核黄素（riboflavin），其异咯嗪环上的第 1 和第 10 位氮原子与活泼的双键连接，此 2 个氮原子可反复接受或释放氢，因而具有可逆的氧化还原性。还原型核黄素及其衍生物呈黄色，于 450nm 处有吸收峰。核黄素虽然对热稳定，但对紫外线敏感，易降解为无活性的产物。

奶与奶制品、肝、蛋类和肉类等是维生素 B_2 的丰富来源。核黄素主要在小肠上段通过转运蛋白主动吸收。吸收后的核黄素在小肠黏膜黄素激酶的催化下转变成黄素单核苷酸（flavin mononucleotide，FMN），后者在焦磷酸化酶的催化下进一步生成黄素腺嘌呤二核苷酸（flavin adenine dinucleotide，FAD），FMN 及 FAD 是维生素 B_2 的活性型。

（二）FMN 和 FAD 是体内氧化还原酶的辅基

FMN 及 FAD 是体内氧化还原酶（如脂酰 CoA 脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、黄嘌呤氧化酶等）的辅基，主要起递氢体的作用。它们参与氧化呼吸链，脂肪酸和氨基酸的氧化以及三羧酸循环。

成人每日需要量为 1.2～1.5mg。维生素 B_2 缺乏时，可引起口角炎、唇炎、阴囊炎、眼睑炎、畏光等症。用光照疗法治疗新生儿黄疸时，在破坏皮肤胆红素的同时，核黄素也可同时遭到破坏，引起新生儿维生素 B_2 缺乏症。

三、维生素 PP 又称抗癞皮病维生素

（一）维生素 PP 是 NAD^+ 和 $NADP^+$ 的组成成分

维生素 PP 包括尼克酸（烟酸，nicotinic acid）和尼克酰胺（烟酰胺，nicotinamide），两者均属吡啶衍生物。维生素 PP 广泛存在于自然界。食物中的维生素 PP 均以尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+）或尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（$NADP^+$）的形式存在，它们在小肠内被水解生成游离的维生素 PP，并被吸收。运输到组织细胞后，维生素 PP 再合成辅酶 NAD^+ 或 $NADP^+$。NAD^+ 和 $NADP^+$ 是维生素 PP 在体内的活性型。过量的维生素 PP 随尿排出体外。

体内色氨酸代谢也可生成维生素 PP，但效率较低，60mg 色氨酸仅能生成 1mg 尼克酸。

（二）维生素 PP 缺乏可引起癞皮病

NAD^+ 和 $NADP^+$ 在体内是多种不需氧脱氢酶的辅酶，分子中的尼克酰胺部分具有可逆的加氢及脱氢的特性。

人类维生素 PP 缺乏症称为癞皮病（pellagra），主要表现有皮炎、腹泻及痴呆。皮炎常对称的出现于暴露部位；痴呆则是神经组织变性的结果。维生素 PP 又称抗癞皮病维生素。

抗结核药物异烟肼的结构与维生素 PP 相似，两者有拮抗作用，长期服用异烟肼可能引起维生素 PP 缺乏。

近年来，尼克酸作为药物已用于临床治疗高胆固醇血症。尼克酸能抑制脂肪动员，使肝中 VLDL 的合成下降，从而降低血浆胆固醇。但如此大量服用尼克酸或尼克酰胺（每日 1～6g）会引发血管扩张、脸颊潮红、痤疮及胃肠不适等毒性症状。长期日服用量超过 500mg 可引起肝损伤。

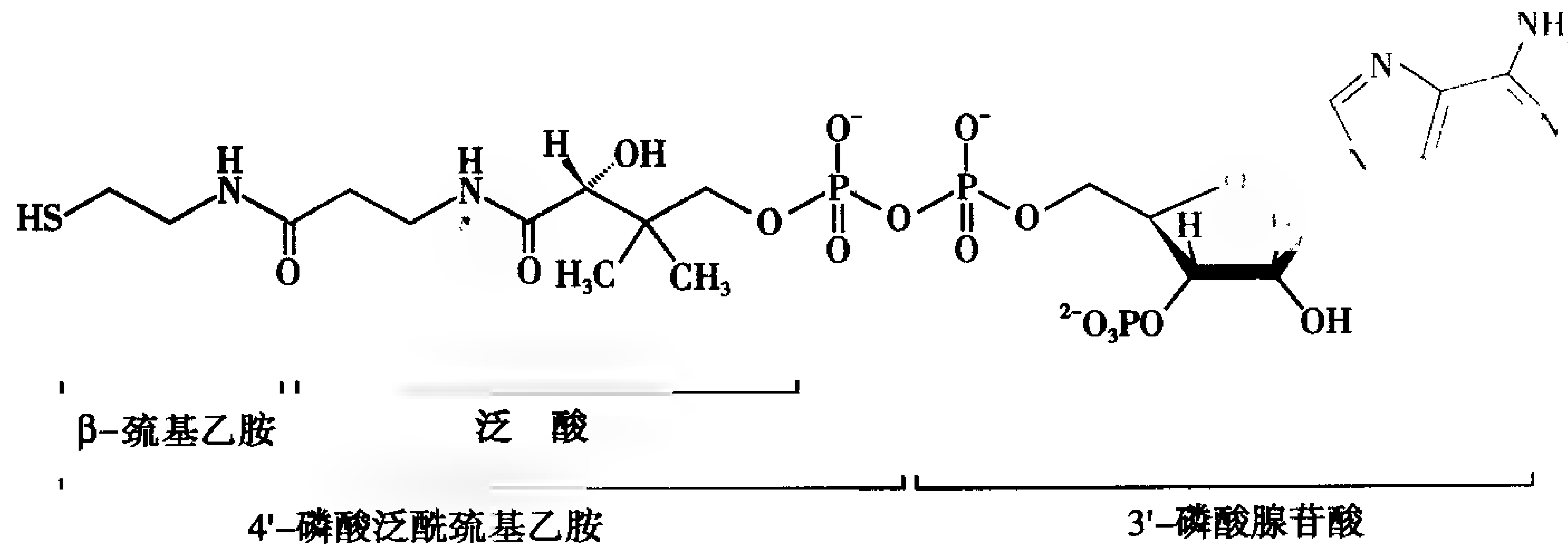
四、泛酸主要参与酰基转移反应

（一）泛酸在辅酶 A 和酰基载体蛋白分子中发挥作用

泛酸（pantothenic acid）又称遍多酸，由二甲基羟丁酸和 β-丙氨酸组成，因广泛存在于动、植物组织中而得名。泛酸在肠内被吸收后，经磷酸化并与半胱氨酸反应生成 4-磷酸泛酰巯基乙胺，后者是辅酶 A（CoA）及酰基载体蛋白（acyl carrier protein，ACP）的组成部分，参与酰基转移反应。CoA 和 ACP 是泛酸在体内的活性型（图 18-7）。

（二）泛酸参与酰基转移反应

在体内，CoA 及 ACP 构成酰基转移酶的辅酶，广泛参与糖、脂类、蛋白质代谢及肝的生物转化作用。约有 70 多种酶需 CoA 及 ACP。泛酸缺乏症很少见。



●图 18-7　辅酶 A（CoA）的结构式

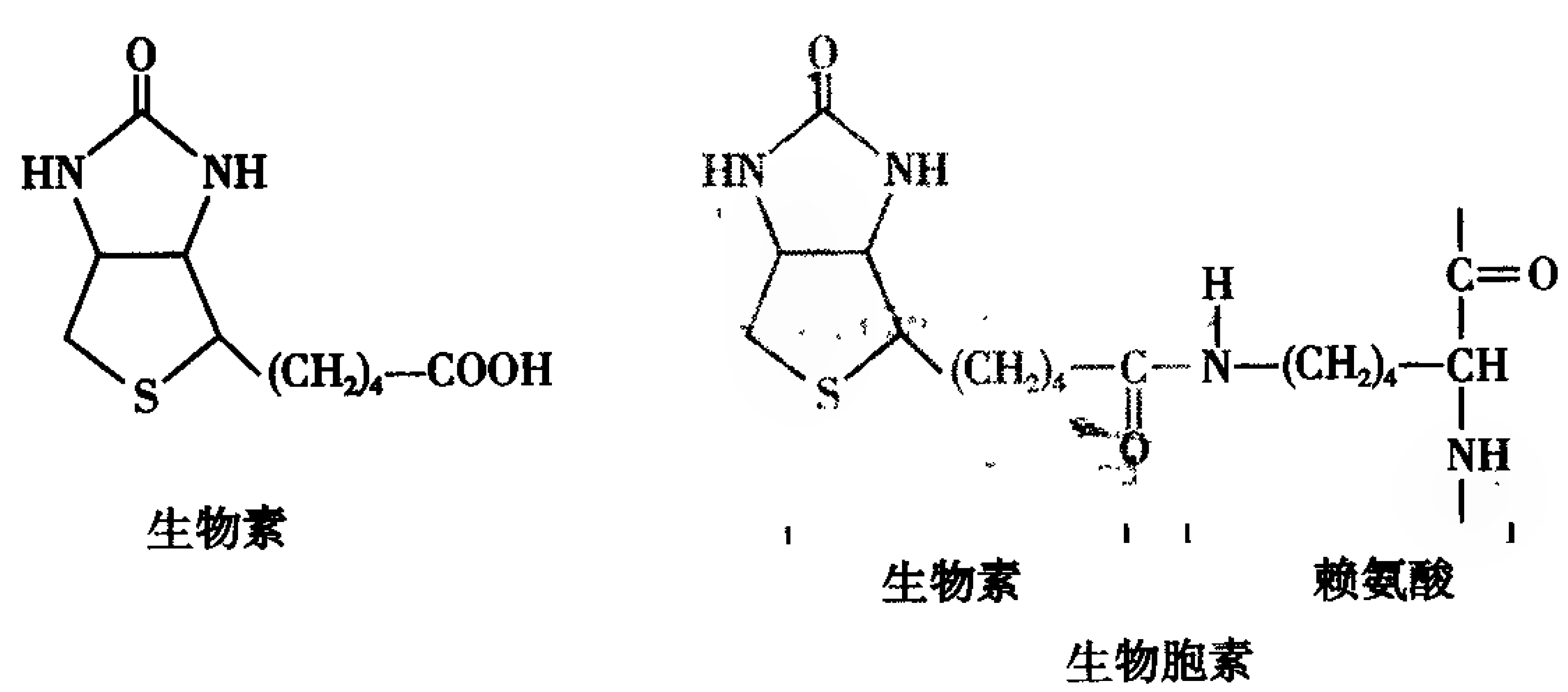
五、生物素参与 CO_2 固定反应

（一）生物素的来源广泛

生物素（biotin）广泛分布于酵母、肝、蛋类、花生、牛奶和鱼类等食品中，人肠菌也能合成。生物素为无色针状结晶体，耐酸而不耐碱，氧化剂及高温可使其失活。

（二）生物素是多种羧化酶的辅基

生物素是体内多种羧化酶的辅基，在羧化酶全酶合成酶（holocarboxylase synthetase）的催化下与羧化酶蛋白中赖氨酸残基的 ε-氨基以酰胺键共价结合，形成生物胞素（biocytin）残基，羧化酶则转变成有催化活性的酶（图 18-8）。生物素作为丙酮酸羧化酶、乙酰 CoA 羧化酶等的辅基，参与 CO_2 固定过程。



●图 18-8　生物素和生物胞素的结构式

近年的研究证明，生物素除了作为羧化酶的辅基外，还有其他重要的生理作用。现已鉴定，人基因组中含有 2000 多个依赖生物素的基因。生物素参与细胞信号转导和基因表达。生物素还可使组蛋白生物素化，从而影响细胞周期、转录和 DNA 损伤的修复。

生物素的来源极为广泛，人体肠道细菌也能合成，很少出现缺乏症。新鲜鸡蛋中有一种抗生物素蛋白（avidin），它能与生物素结合而不能被吸收。蛋清加热后这种蛋白因遭破坏而失去作用。长期使用抗生素可抑制肠道细菌生长，也可能造成生物素的缺乏，主要症状是疲乏、恶心、呕吐、食欲不振、皮炎及脱屑性红皮病。

六、维生素 B_6 包括吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺

（一）维生素 B_6 的磷酸酯是其活性形式

维生素 B_6 包括吡哆醇（pyridoxine）、吡哆醛（pyridoxal）和吡哆胺（pyridoxamine），

其活化形式是磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺，两者可相互转变。体内约 80%的维生素 B_6 以磷酸吡哆醛的形式存在于肌肉中，并与糖原磷酸化酶相结合。

维生素 B_6 广泛分布于动、植物食品中。肝、鱼、肉类、全麦、坚果、豆类、蛋黄和酵母均是维生素 B_6 的丰富来源。维生素 B_6 的磷酸酯在小肠碱性磷酸酶的作用下水解，以脱磷酸的形式吸收。吡哆醛和磷酸吡哆醛是血液中的主要运输形式。

（二）磷酸吡哆醛的辅酶作用多种多样

1. 磷酸吡哆醛是多种酶的辅酶 磷酸吡哆醛是体内百余种酶的辅酶，参与氨基酸脱氨与转氨作用、鸟氨酸循环、血红素的合成和糖原分解等，在代谢中发挥着重要作用。

磷酸吡哆醛是谷氨酸脱羧酶的辅酶，增进大脑抑制性神经递质 γ 氨基丁酸的生成，临床上常用维生素 B_6 治疗小儿惊厥、妊娠呕吐和精神焦虑等。磷酸吡哆醛还是血红素合成的限速酶 δ-氨基-γ-酮戊酸（ALA）合酶的辅酶。维生素 B_6 缺乏时血红素的合成受阻，造成低血色素小细胞性贫血和血清铁增高。

近年发现，高同型半胱氨酸血症（hyperhomocysteinemia）是心血管疾病、血栓生成和高血压的危险因子。同型半胱氨酸除了甲基化生成甲硫氨酸外，还可分解生成半胱氨酸。维生素 B_6 是催化同型半胱氨酸分解代谢酶的辅酶。已知，2/3 以上的高同型半胱氨酸血症与叶酸、维生素 B_{12} 和维生素 B_6 的缺乏有关。维生素 B_6 对治疗上述疾病有一定的作用。

2. 磷酸吡哆醛可终止类固醇激素的作用 磷酸吡哆醛可以将类固醇激素-受体复合物从 DNA 中移去，终止这些激素的作用。维生素 B_6 缺乏时，可增加人体对雌激素、雄激素、皮质激素和维生素 D 作用的敏感性。这对于乳腺、前列腺和子宫的激素依赖性癌症的发展可能是重要的。维生素 B_6 还可能影响其预后。

3. 维生素 B_6 缺乏不多见，而过量可引起中毒 人类未发现维生素 B_6 缺乏的典型病例。异烟肼能与磷酸吡哆醛的醛基结合，使其失去辅酶作用，所以在服用异烟肼时，应补充维生素 B_6。

维生素 B_6 与其他水溶性维生素不同，过量服用维生素 B_6 可引起中毒。日摄入量超过 200mg 可引起神经损伤，表现为周围感觉神经病。

七、叶酸以四氢叶酸形式参与一碳单位代谢

（一）四氢叶酸是叶酸的活性形式

叶酸（folic acid）因绿叶中含量十分丰富而得名，又称蝶酰谷氨酸。酵母、肝、水果和绿叶蔬菜是叶酸的丰富来源。肠菌也有合成叶酸的能力。植物中的叶酸多含 7 个谷氨酸残基，谷氨酸之间以 γ-肽键相连。仅牛奶和蛋黄中含蝶酰单谷氨酸。

食物中的蝶酰多谷氨酸在小肠被水解，生成蝶酰单谷氨酸。后者易被小肠上段吸收，在小肠黏膜上皮细胞二氢叶酸还原酶的作用下，生成叶酸的活性型——5,6,7,8-四氢叶酸（FH_4）。含单谷氨酸的甲基四氢叶酸是四氢叶酸在血液循环中的主要形式。在体内各组织中，四氢叶酸主要以多谷氨酸形式存在。

（二）四氢叶酸是一碳单位的载体

FH_4 是体内一碳单位转移酶的辅酶，分子中 N_5、N_{10} 是一碳单位的结合位点。一碳单位在体内参加嘌呤、胸腺嘧啶核苷酸等多种物质的合成。叶酸缺乏时，DNA 合成受到抑制，骨髓幼红细胞 DNA 合成减少，细胞分裂速度降低，细胞体积变大，造成巨幼红细胞性贫血（megaloblastic anemia）。

抗癌药物甲氨蝶呤和氨蝶呤因其结构与叶酸相似，能抑制二氢叶酸还原酶的活性，使

四氢叶酸合成减少，进而抑制体内胸腺嘧啶核苷酸的合成，起到抗癌作用。

叶酸的应用可以降低胎儿脊柱裂和神经管缺乏的危险性。叶酸缺乏可引起高同型半胱氨酸血症，增加动脉粥样硬化、血栓生成和高血压的危险性。每日服用 500μg 叶酸有益于预防冠心病的发生。叶酸缺乏可引起 DNA 低甲基化（hypomethylation），增加一些癌症（如结肠直肠癌）的危险性。富含叶酸的食物可降低这些癌症的风险。

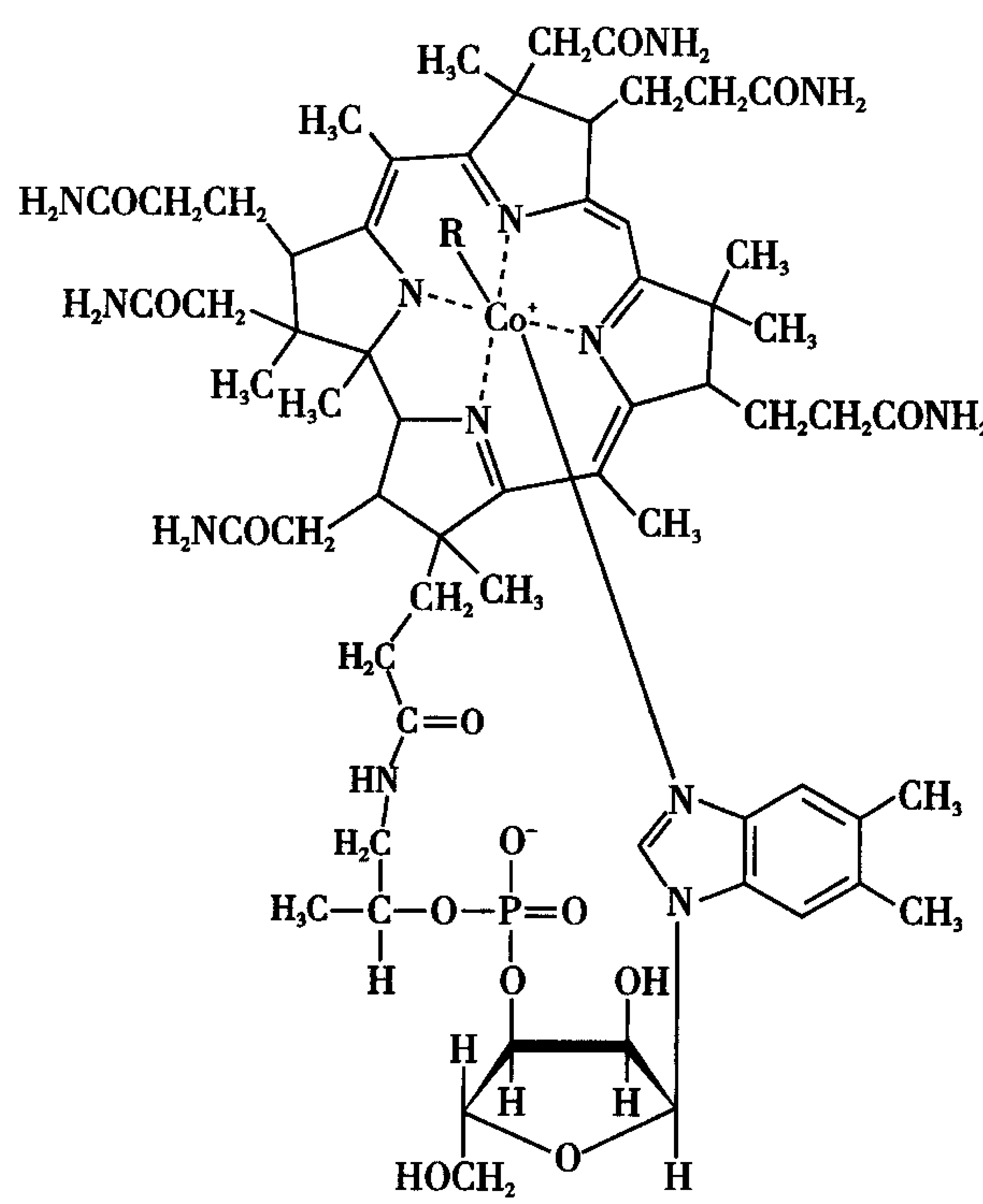
叶酸在食物中含量丰富，肠道的细菌也能合成，一般不发生缺乏症。孕妇及哺乳期应适量补充叶酸。口服避孕药或抗惊厥药能干扰叶酸的吸收及代谢，如长期服用此类药物时应考虑补充叶酸。

八、维生素 B_{12} 是含钴维生素

（一）维生素 B_{12} 的吸收需要内因子

维生素 B_{12} 又称钴胺素（cobalamin），是唯一含金属元素的维生素，仅由微生物合成，酵母和动物肝含量丰富，不存在于植物。维生素 B_{12} 在体内的主要存在形式有氰钴胺素、羟钴胺素、甲钴胺素和 5′-脱氧腺苷钴胺素。后两者是维生素 B_{12} 的活性型（图 18-9）。

食物中的维生素 B_{12} 常与蛋白质结合而存在，在胃酸和胃蛋白酶的作用下，维生素 B_{12} 得以游离并与来自唾液的亲钴蛋白（cobalophilin）结合。在十二指肠，亲钴蛋白-B_{12} 复合物经胰蛋白酶的水解作用游离出维生素 B_{12}，后者需要与一种由胃黏膜细胞分泌的内因子（intrinsic factor，IF）紧密结合生成 IF-B_{12} 复合物，才能被回肠吸收。IF 是分子量为 50kD 的糖蛋白，只与活性型 B_{12} 以 1∶1 结合。当胰腺功能障碍时，因亲钴蛋白-B_{12} 不能分解而排出体外，从而导致 B_{12} 缺乏症。在小肠黏膜上皮细胞内，IF-B_{12} 分解并游离出 B_{12}。B_{12} 再与一种称之为转钴胺素 Ⅱ（transcobalamin Ⅱ）的蛋白结合存在于血液中。转钴胺素Ⅱ-B_{12} 复合物与细胞表面受体结合，进入细胞，在细胞内 B_{12} 转变成羟钴胺素、甲钴胺素或进入线粒体转变成 5′-脱氧腺苷钴胺素。肝内还有一种转钴胺素 Ⅰ，可与 B_{12} 结合而贮存于肝内。



●图 18-9 维生素 B_{12}（甲钴胺素）的结构式

（二）维生素 B_{12} 影响一碳单位的代谢和脂肪酸的合成

维生素 B_{12} 是 N_5-CH_3-FH_4 转甲基酶（甲硫氨酸合成酶）的辅酶，催化同型半胱氨酸甲基化生成甲硫氨酸。B_{12} 缺乏时，N_5-CH_3-FH_4 上的甲基不能转移出去，一是引起甲硫氨酸合成减少，二是影响四氢叶酸的再生，组织中游离的四氢叶酸含量减少，一碳单位的代谢受阻，造成核酸合成障碍，产生巨幼红细胞性贫血，即恶性贫血。同型半胱氨酸的堆积可造成高同型半胱氨酸血症，增加动脉硬化、血栓生成和高血压的危险性。

5′-脱氧腺苷钴胺素是 *L*-甲基丙二酰 CoA 变位酶的辅酶，催化琥珀酰 CoA 的生成。当 B_{12} 缺乏时，*L*-甲基丙二酰 CoA 大量堆积。因 *L*-甲基丙二酰 CoA 的结构与脂肪酸合成的中

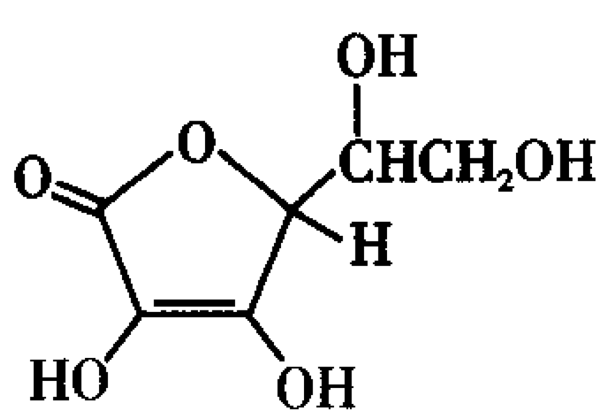
间产物丙二酰 CoA 相似，从而影响脂肪酸的正常合成。B_{12}缺乏所导致的神经疾患便是由于脂肪酸的合成异常而影响髓鞘质的转换，造成髓鞘质变性退化，引发进行性脱髓鞘。所以 B_{12}具有营养神经的作用。

B_{12}广泛存在于动物食品中，正常膳食者很难发生缺乏症，但偶见于有严重吸收障碍疾患的病人及长期素食者。

九、维生素 C 又称抗坏血病维生素

(一) 维生素 C 是对热不稳定的酸性物质

维生素 C 又称 *L*-抗坏血酸 (ascorbic acid) (图 18-10)，呈酸性。抗坏血酸分子中 C_2 和 C_3 羟基可以氧化脱氢生成脱氢抗坏血酸。后者又可接受氢再还原成抗坏血酸。



●图 18-10 维生素 C 的结构式

人类和其他灵长类、豚鼠等动物体内不能合成维生素 C，必须由食物供给。维生素 C 广泛存在于新鲜蔬菜和水果中。植物中的抗坏血酸氧化酶能将维生素 C 氧化灭活为二酮古洛糖酸，所以久存的水果和蔬菜中维生素 C 含量会大量减少。干种子中虽然不含维生素 C，但其幼芽可以合成，所以豆芽等是维生素 C 的丰富来源。维生素 C 对碱和热不稳定，烹饪不当可引起维生素 C 的大量丧失。

维生素 C 极易从小肠吸收。还原型抗坏血酸是细胞内与血液中的主要存在形式。血液中脱氢抗坏血酸仅为抗坏血酸的 1/15。

(二) 维生素 C 既是一些羟化酶的辅酶又是强抗氧化剂

1. 维生素 C 是一些羟化酶的辅酶 抗坏血酸是维持体内含铜羟化酶和 α-酮戊二酸 铁羟化酶活性必不可少的辅因子。在含酮羟化酶催化的反应中，Cu^{+}被氧化生成 Cu^{2+}，后者在抗坏血酸的专一作用下，再还原为 Cu^{+}。

(1) 苯丙氨酸代谢过程中，对羟苯丙酮酸羟化酶催化对羟苯丙酮酸羟化生成尿黑酸。维生素 C 缺乏时，尿中可出现大量对羟苯丙酮酸。多巴胺 β-羟化酶催化多巴胺羟化生成去甲肾上腺素，参与肾上腺髓质和中枢神经系统中儿茶酚胺的合成。维生素 C 的缺乏可引起这些器官中儿茶酚胺的代谢异常。

(2) 维生素 C 是胆汁酸合成的限速酶——7α-羟化酶的辅酶，参与将 40%的胆固醇正常转变成胆汁酸。此外，肾上腺皮质类固醇合成过程中的羟化作用也需要维生素 C 参与。维生素 C 缺乏直接影响胆固醇转化，引起体内胆固醇增多，成为动脉硬化的危险因素。

(3) 许多需要维生素 C 的含铁羟化酶参与蛋白质翻译后的修饰工作。胶原脯氨酸羟化酶和赖氨酸羟化酶分别催化前胶原分子中脯氨酸和赖氨酸残基的羟化，促进成熟的胶原分子的生成。维生素 C 是维持这些酶活性所必需的辅助因子。胶原是骨、毛细血管和结缔组织的重要构成成分。脯氨酸羟化酶也为骨钙蛋白 (osteocalcin) 和补体 C1q 生成所必需。维生素 C 缺乏导致坏血病 (scurvy)，表现为毛细血管脆性增强易破裂、牙龈腐烂、牙齿松动、骨折以及创伤不易愈合等。由于机体在正常状态下可储存一定量的维生素 C，坏血病的症状常在维生素 C 缺乏 3～4 个月后出现。

(4) 体内肉碱合成过程需要两个依赖维生素 C 的羟化酶。维生素 C 缺乏时，由于脂肪酸 β-氧化减弱，病人出现的倦怠乏力也是坏血病的症状之一。

2. 维生素 C 作为抗氧化剂可直接参与体内氧化还原反应

(1) 维生素 C 具有保护巯基的作用，它可使巯基酶的—SH 保持还原状态。维生素 C 在谷胱甘肽还原酶作用下，将氧化型谷胱甘肽 (G—S—S—G) 还原成还原型 (G—SH)。还原型 G—SH 能清除细胞膜的脂质过氧化物，起到保护细胞膜的作用。

（2）维生素C能使红细胞中高铁血红蛋白（MHb）还原为血红蛋白（Hb），使其恢复运氧能力。

（3）小肠中的维生素C可将Fe^{3+}还原成Fe^{2+}，有利于食物中铁的吸收。

（4）维生素C作为抗氧化剂，影响细胞内活性氧敏感的信号转导系统（如NF-κB和AP-1）。从而调节基因表达和细胞功能，促进细胞分化。

3. 维生素C具有增强机体免疫力的作用　维生素C促进体内抗菌活性、NK细胞活性、促进淋巴细胞增殖和趋化作用、提高吞噬细胞的吞噬能力、促进免疫球蛋白的合成，从而提高机体免疫力。临床上用于心血管疾病、病毒性疾病等的支持性治疗。

我国建议成人每日的需要量为60mg。若每日摄取维生素C超过100mg，体内维生素C便可达到饱和。过量摄入的维生素C则随尿排出体外。

现将各种维生素的来源、功能等列于表18-1。

表18-1　各种维生素的来源与功能

维生素	活性形式	食物来源	日需要量	主要功能	缺乏症与中毒
维生素A（类视黄素）	视黄醛，视黄酸	肝、蛋黄、牛奶、绿叶蔬菜、胡萝卜、鱼肝油、玉米等	80μg（2600IU）	1. 构成视紫红质 2. 维持上皮组织结构的完整，增强免疫力 3. 促进生长发育 4. 抗氧化作用	缺乏症：夜盲症、干眼病、皮肤干燥、毛囊丘疹 中毒：神经、肝与皮肤损伤，高脂血症与高钙血症，骨与软组织钙化
维生素D（钙化醇）	1,25-$(OH)_2D_3$	肝、蛋黄、牛奶、鱼肝油	5～10μg（200～400IU）	1. 调节钙磷代谢：促进小肠钙、磷吸收；促进肾小管钙、磷吸收 2. 促进骨盐代谢与骨的正常生长 3. 组织细胞分化、免疫调节等	缺乏症：佝偻病（儿童） 软骨病（成人） 中毒：高钙血症、高血压、软组织钙化
维生素E（生育酚）	生育酚	植物油	8～10mg	1. 抗氧化作用，保护生物膜 2. 维持生殖功能 3. 促血红素生成 4. 对基因的调节作用	人类未发现缺乏症，临床用于治疗习惯性流产
维生素K（凝血维生素）	甲基1,4-萘醌	肝、绿色蔬菜	60～80μg	1. 促进肝合成凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ、抗凝血因子蛋白C、蛋白S 2. 维持骨盐含量，减少动脉钙化	缺乏症：皮下出血、肌肉及胃肠道出血
维生素B_1（硫胺素）	TPP	酵母、豆、瘦肉、谷类外壳、皮及胚芽	1.2～1.5mg	1. α-酮酸氧化脱羧酶的辅酶 2. 抑制胆碱酯酶活性 3. 转酮基反应	缺乏症：脚气病、末梢神经炎
维生素B_2（核黄素）	FMN，FAD	肝、蛋黄、牛奶、绿叶蔬菜	1.2～1.5mg	构成黄素酶的辅酶，参与生物氧化体系	缺乏症：口角炎、舌炎、唇炎、阴囊炎
维生素PP（尼克酸、尼克酰胺）	NAD^+，$NADP^+$	肉、酵母、谷类、花生、胚芽、肝	15～20mg	构成脱氢酶的辅酶，参与生物氧化体系	缺乏症：癞皮病 中毒：血管扩张、脸颊潮红、痤疮及胃肠不适、肝损伤

续表

维生素	活性形式	食物来源	日需要量	主要功能	缺乏症与中毒
维生素 B_6（吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺）	磷酸吡哆醛磷酸吡哆胺	谷类胚芽、肝	2mg	1. 氨基酸脱羧酶和转氨酶的辅酶 2. ALA合酶的辅酶 3. 同型半胱氨酸分解代谢酶的辅酶 4. 对类固醇激素的作用发挥调节作用	缺乏症：高同型半胱氨酸血症（与动脉硬化、血栓生成与高血压相关） 中毒：周围感觉神经病
泛酸（遍多酸）	CoA，ACP	动、植物组织		构成辅酶A的成分，参与体内酰基的转移，构成ACP成分，参与脂肪酸合成	人类未发现缺乏症
生物素	生物素辅基	动、植物组织		1. 构成羧化酶的辅基，参与 CO_2 固定 2. 参与细胞信号转导和基因表达，影响细胞周期、转录和DNA损伤的修复	人类未发现缺乏症
叶酸	四氢叶酸	肝、酵母、绿叶蔬菜	200～400μg	参与一碳单位的转移，与蛋白质、核酸合成、红细胞、白细胞成熟有关	缺乏症：1. 巨幼红细胞贫血 2. 高同型半胱氨酸血症（与动脉硬化、血栓生成及高血压相关）和DNA低甲基基化（与癌症相关）
维生素 B_{12}	甲钴胺素、5′-脱氧腺苷钴胺素	肝、肉、鱼、牛奶	2～3μg	1. 促进甲基转移 2. 促进DNA合成 3. 促进红细胞成熟 4. 琥珀酰CoA的生成	缺乏症：1. 巨幼红细胞贫血 2. 高同型半胱氨酸血症 3. 神经脱髓鞘
维生素C（抗坏血酸）	抗坏血酸	新鲜水果、蔬菜，特别是番茄和柑橘	60mg	1. 参与体内羟化反应 2. 参与抗氧化作用 3. 增强免疫力作用 4. 促进铁吸收	坏血病

第三节 钙、磷代谢

一、钙、磷在体内分布广泛、功能重要

（一）钙既是骨的主要成分又具有重要的调节作用

钙（calcium）是人体内含量最多的无机元素之一，成人含量约为30mol（1200g/70kg体重），仅次于碳、氢、氧和氮。人体内99%以上的钙分布于骨中，以羟基磷灰石[hydroxyapatite，$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$]的形式存在。钙构成骨和牙的主要成分，起着支持和保护作用。

成人血浆（或血清）中的钙含量为2.25～2.75mmol/L（9～11mg/dl），不到人体总量的0.1%，其中，约一半是游离 Ca^{2+}；另一半是蛋白结合钙，这部分钙主要与清蛋白结

合，少量与球蛋白结合。游离钙与蛋白结合钙在血浆中呈动态平衡状态。血浆 pH 可影响它们的平衡。当 pH 升高时，蛋白结合钙增多，而游离钙减少；反之，当血浆偏酸时，蛋白结合钙解离，血浆游离钙增多。平均每增减 1 个 pH 单位，每 100ml 血浆游离钙浓度相应改变 0.42mmol（1.68mg）。血钙的正常水平对于维持骨骼内骨盐的含量、血液凝固过程和神经肌肉的兴奋性具有重要的作用。

分布于体液和其他组织中的钙不足总钙量的 1%。细胞外液游离钙的浓度为 1.12～1.23mmol/L；细胞内钙浓度极低，且 90%以上储存于内质网和线粒体内，胞液钙浓度仅 0.01～0.1mol/L。胞液钙作为第二信使在信号转导中发挥许多重要的生理作用。肌肉中的钙可启动骨骼肌和心肌细胞的收缩。

（二）磷是体内许多重要生物分子的组成成分

正常成人含磷（phosphorus）约 19.4mol（600g），主要分布于骨（约占 85.7%），其次为各组织细胞（约 14%），仅少量（约 0.03%）分布于体液。成人血浆中无机磷的含量约为 1.1～1.3mmol/L（3.5～4.0mg/dl）。

磷除了构成骨盐成分、参与成骨作用外，还是核酸、核苷酸、磷脂、辅酶等重要生物分子的组成成分，发挥各自重要的生理功能。许多生化反应和代谢调节过程需要磷酸根的参与。无机磷酸盐还是机体中重要的缓冲体系成员。

正常人血液中钙和磷的浓度相当恒定，每 100ml 血液中钙与磷含量 ml 数之积为一常数，即 [Ca]×[P] =35～40。因此，血钙降低时，血磷会略有增加。

二、钙和磷的代谢与骨的代谢密切相关

（一）钙和磷的吸收与排泄的影响因素颇多

牛奶、豆类和叶类蔬菜是人体内钙的主要来源。十二指肠和空肠上段是钙吸收的主要部位。钙盐在酸性溶液中易溶解，凡使消化管内 pH 下降的食物均有利于钙的吸收。维生素 D 能促进钙和磷的吸收。碱性磷酸盐、草酸盐和植酸盐可与钙形成不溶解的钙盐，不利于钙的吸收。钙的吸收随年龄的增长而下降。

正常成人肾小球每日滤过约 9g 游离钙，肾小管对钙的重吸收量与血钙浓度相关。血钙浓度降低可增加肾小管对钙的重吸收率，而血钙高时吸收率下降。肾对钙的重吸收受甲状旁腺激素的严格调控。

成人每日进食 1.0～1.5g 磷，食物中的有机磷酸酯和磷脂在消化液中磷酸酶的作用下，水解生成无机磷酸盐并在小肠上段被吸收。钙、镁、铁可与磷酸根生成不溶性化合物而影响其吸收。

肾小管对血磷的重吸收也取决于血磷水平，血磷浓度降低可增高磷的重吸收率。血钙增加可降低磷的重吸收。pH 降低可增加磷的重吸收。甲状旁腺激素抑制血磷的重吸收，增加磷的排泄。

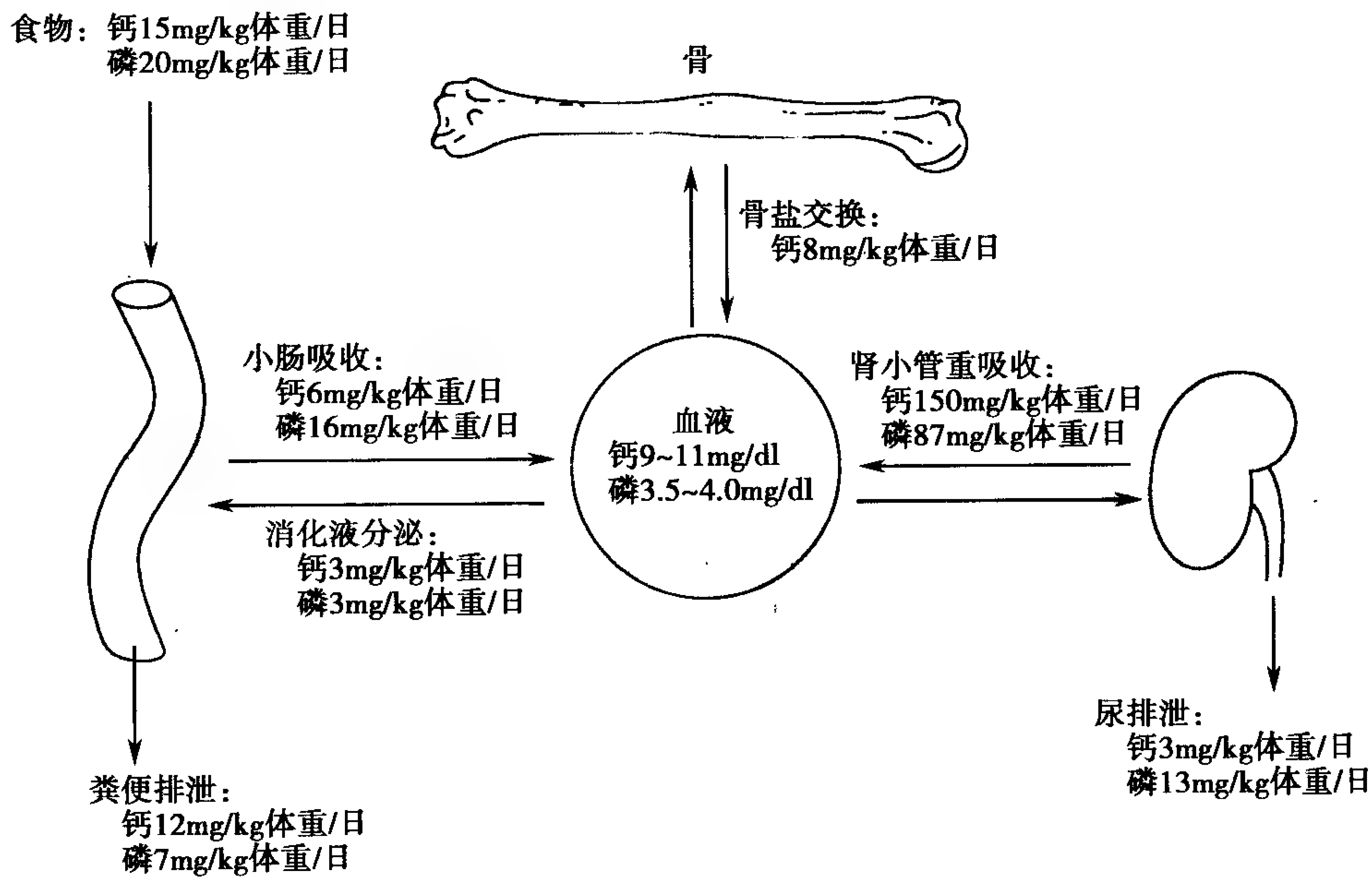
（二）骨内钙和磷的代谢是体内钙磷代谢主要组成

由于体内大部位钙和磷存在于骨中，所以骨内钙、磷的代谢成为体内钙磷代谢的主要组成。血钙与骨钙的相互转化对维持血钙浓度的相对稳定具有重要意义。

骨的组成中水占 10%；有机物质占 20%，主要的有机基质是 I 型胶原；无机盐占 70%，主要是羟基磷灰石。骨形成的初期，成骨细胞分泌胶原，胶原聚合成胶原纤维，并进而形成骨的有机基质。钙盐沉积于其表面，逐渐形成羟基磷灰石骨盐结晶。少量无定形骨盐与羟基磷灰石结合疏松，可与细胞外液进行钙交换，与体液钙形成动态平衡。碱性磷

酸酶可以分解磷酸酯和焦磷酸盐，使局部无机磷酸盐浓度升高，有利于骨化作用。因此，血液碱性磷酸酶活性增高可作为骨化作用或成骨细胞活动的指标。

现将人体内钙、磷代谢与动态平衡图示于图 18-11。



●图 18-11 人体内钙、磷代谢与动态平衡

三、钙和磷代谢受三种激素的调节

调节钙和钙代谢的主要激素有活性维生素 D、甲状旁腺激素和降钙素。主要调节的靶器官有小肠、肾和骨。

(一) 维生素 D 促进小肠钙的吸收和骨盐沉积

前已述及，维生素 D 的活性形式是 1,25-$(OH)_2D_3$。1,25-$(OH)_2D_3$ 对钙磷代谢作用的主要靶器官是小肠和骨。1,25-$(OH)_2D_3$ 与小肠黏膜细胞特异的胞质受体结合后，进入细胞核，刺激钙结合蛋白的生成。后者作为载体蛋白促进小肠对钙的吸收。同时磷的吸收也随之增加。生理剂量的 1,25-$(OH)_2D_3$ 可促进骨盐沉积，同时还可刺激成骨细胞分泌胶原，促进骨基质的成熟，有利于成骨。

(二) 甲状旁腺激素具有升高血钙和降低血磷的作用

甲状旁腺激素（parathyroid hormone，PTH）是甲状旁腺分泌的由 84 个氨基酸残基组成的蛋白质，其主要作用靶器官是骨和肾。PTH 刺激破骨细胞的活化，促进骨盐溶解，使血钙与血磷增高。PTH 促进肾小管对钙的重吸收，抑制对磷的重吸收。同时 PTH 还可刺激肾合成 1,25-$(OH)_2D_3$，从而间接地促进小肠对钙、磷的吸收。PTH 的总体作用是使血钙升高。

(三) 降钙素是唯一降低血钙浓度的激素

降钙素（calcitonin，CT）是甲状腺 C 细胞合成的由 32 个氨基酸残基组成的多肽，其作用靶器官为骨和肾。CT 通过抑制破骨细胞的活性、激活成骨细胞，促进骨盐沉积，从而降低血钙与血磷含量。CT 还抑制肾小管对钙、磷的重吸收。CT 的总体作用是降低血钙与血磷。

血钙与血磷在 1,25-$(OH)_2D_3$、PTH 和 CT 的协同作用下维持其正常的动态平衡。现将三者的作用总结于表 18-2。

表 18-2　1,25-$(OH)_2D_3$、PTH 和 CT 对钙磷代谢的调节

激素	小肠钙吸收	溶骨	成骨	尿钙	尿磷	血钙	血磷
1,25-$(OH)_2D_3$	↑↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑
PTH	↑	↑↑	↓	↓	↑	↑	↓
CT	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓

钙、磷代谢紊乱可引起多种疾病。维生素 D 缺乏可引起钙吸收障碍，从而导致儿童佝偻病（rickets）和成人骨软化症（osteomalacia）。骨基质丧失和进行性骨骼脱盐可导致中、老年人骨质疏松（osteoporosis）。甲状旁腺功能亢进与维生素 D 中毒可引起高血钙症（hypercalcemia）、尿路结石等。

第四节　微量元素

一、铁是体内含量最多的微量元素

铁（iron）是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素系统、铁硫蛋白、过氧化物酶及过氧化氢酶等的重要组成部分，在气体运输、生物氧化和酶促反应中均发挥重要作用。

（一）体内铁主要存在于含铁卟啉和非铁卟啉的蛋白质中

铁是体内含量最多的一种微量元素，成年男性平均含铁量约为每公斤体重 50mg，女性约为每公斤体重 30mg。体内铁约 75%存在于铁卟啉化合物中，25%存在于非铁卟啉类含铁化合物（如含铁的黄素蛋白、铁硫蛋白、运铁蛋白等）中。成年男性及绝经后的妇女每日约需铁 1mg，经期妇女每日平均失铁 0.35～0.7mg，妊娠期妇女每日需要量约为 3.6mg。

（二）运铁蛋白和铁蛋白分别是铁的运输和储存形式

铁的吸收部位主要在十二指肠及空肠上段。无机铁只有 Fe^{2+} 可以通透小肠黏膜细胞。酸性 pH、维生素 C 和谷胱甘肽可将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+}，有利于铁的吸收。鞣酸、草酸、植酸、大量无机磷酸、含磷酸的抗酸药等可与铁形成不溶性或不能吸收的铁复合物，从而影响铁的吸收。络合物中铁的吸收率大于无机铁，氨基酸、柠檬酸、苹果酸等能与铁离子形成络合物，有利于铁的吸收。临床上常用硫酸亚铁、枸橼酸铁铵、富马酸亚铁等作为口服补铁药剂。血红素铁的吸收机制不同于非血红素铁，其吸收率远高于非血红素铁。

吸收的 Fe^{2+} 在小肠黏膜上皮细胞中氧化为 Fe^{3+}，并与铁蛋白（ferritin）结合。铁（Fe^{3+}）在血液中与运铁蛋白（transferrin）结合而运输。正常人血清运铁蛋白浓度为 200～300mg/dl。

体内多余的铁以铁蛋白的形式主要储存于肝、脾、骨髓、小肠黏膜、胰等器官。铁蛋白是由 24 个亚基组成的中空分子，其内可结合多达 450 个铁离子。

小肠黏膜上皮细胞的生命周期为 2～6 天，储存于细胞内有铁蛋白铁随着细胞的脱落而排泄于肠腔。这几乎是体内铁的唯一排泄途径。尿、汗、消化液、胆汁中均不含铁。

（三）铁的缺乏与中毒均可引起严重的疾病

铁的缺乏可引起小细胞低血色性贫血。引起缺铁性贫血的原因不限于铁摄入的不足，

急性大量出血、慢性小量出血（如消化道溃疡、妇女月经失调出血等）以及儿童生长期和妇女妊娠、哺乳期得不到铁的额外补充等均可引起缺铁性贫血。

Fe^{2+}非常活泼，可与氧反应产生羟自由基和过氧化自由基。Fe^{2+}还像重金属离子那样，与体内蛋白质结合，破坏其结构。所以体内铁在储存与运输过程中均为Fe^{3+}，并与特异的蛋白相结合。多年铁摄入过剩，部分铁蛋白变性生成血铁黄素（hemosiderin），体内铁沉积过多时可出现血色素沉着症（hemochromatosis），引起器官损伤，可出现肝硬化、肝癌、糖尿病、心肌病、皮肤色素沉着、内分泌紊乱、关节痛等。

二、锌是含锌金属酶和锌指蛋白的组成成分

锌（zinc）在人体内的含量仅次于铁，约为1.5～2.5g。成人每日需锌15～20mg。肉类、豆类、坚果、麦胚等含锌丰富。锌主要在小肠吸收，但不完全。某些地区的谷物中含有较多的能与锌形成不溶性复合物的6-磷酸肌醇，从而影响锌的吸收。血中锌与清蛋白或运铁蛋白结合而运输。血锌浓度约为0.1～0.15mmol/L。体内储存的锌主要与金属硫蛋白（metallothionein）结合。锌主要经粪排泄，其次为尿、汗、乳汁等。

锌是含锌金属酶的组成成分，与80多种酶的活性有关，如碳酸酐酶、铜-锌-超氧化物歧化酶、醇脱氢酶、羧基肽酶A和B、DNA和RNA聚合酶等。人类基因组可编码300余种锌指蛋白。许多蛋白质，如反式作用因子、类固醇激素和甲状腺素受体的DNA结合区，都有锌参与形成的锌指结构。锌指结构在转录调控中起重要作用。已知锌是重要的免疫调节剂、生长辅因子，在抗氧化、抗细胞凋亡和抗炎症中均起重要作用。

锌缺乏可引起皮肤炎、伤口愈合缓慢、脱发、神经精神障碍。儿童可出现发育不良和睾丸萎缩。

三、铜是体内多种含铜酶的辅基

成人体内铜（copper）的含量约为80～110mg，肌肉中约占50%，10%存在于肝。成人每日需铜约1～3mg，孕妇和成长期的青少年可略有增加。铜主要在十二指肠吸收。血液中约60%的铜与铜蓝蛋白（ceruloplasmin）紧密结合，其余的与清蛋白疏松结合或与组氨酸形成复合物。铜主要随胆汁排泄。

铜是体内多种酶的辅基，含铜的酶多以氧分子或氧的衍生物为底物。如细胞色素氧化酶、多巴胺β-羟化酶、单胺氧化酶、酪氨酸酶、胞质超氧化物歧化酶等。铜蓝蛋白可催化Fe^{2+}氧化成Fe^{3+}，后者转入运铁蛋白，有利于铁的运输。

已知，铜通过增强血管生成素（angiogenin）对内皮细胞的亲和力、增加血管内皮生长因子（VEGF）和相关细胞因子的表达与分泌，促进血管生成。铜的络合剂有助于癌症的治疗。

铜缺乏的特征性表现为小细胞低色素性贫血、白细胞减少、出血性血管改变、骨脱盐、高胆固醇血症和神经疾患等。铜摄入过多也会引起中毒现象，如蓝绿粪便、唾液以及行动障碍等。

四、锰是多种酶的组成成分和激活剂

正常人体内含锰（manganese）约12～20mg。成人每日需2～5mg。锰主要从小肠吸收，入血后大部分与血浆中γ-球蛋白和清蛋白结合而运输。少量与运铁蛋白结合。锰在体

内主要储存于骨、肝、胰和肾。锰主要从胆汁排泄，少量随胰液排出，尿中排泄很少。

体内锰主要是多种酶的组成成分和激活剂。锰金属酶有精氨酸酶、谷氨酰胺合成酶、磷酸烯醇式丙酮酸脱羧酶、Mn-超氧化物歧化酶、RNA 聚合酶等。体内锰对多种酶的激活作用可被镁所代替。体内正常免疫功能、血糖与细胞能量调节、生殖、消化、骨骼生长、抗自由基等均需要锰。缺锰时生长发育会受到影响。

过量摄入锰可引起中毒。锰可抑制呼吸链中复合物Ⅰ和 ATP 酶的活性，造成氧自由基的过量产生。锰干扰多巴胺的代谢，导致精神病和帕金森神经功能障碍（锰疯狂）。

五、硒以硒半胱氨酸形式参与多种重要硒蛋白的组成

人体含硒（selenium）约为 14～21mg。成人日需要量在 30～50μg。硒在十二指肠吸收。入血后与 α 和 β 球蛋白结合，小部分与 VLDL 结合而运输，主要随尿及汗液排泄。

硒在体内以硒半胱氨酸（selenocysteine）的形式存在于近 30 种蛋白质中。这些含硒半胱氨酸的蛋白质称为硒蛋白。谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GPx）、硒蛋白 P（selenoprotein P，Se-P）、硫氧还蛋白还原酶（thioredoxin reductase，Trx）、碘甲腺原氨酸脱碘酶（iodothyronine deiodinase）均属此类。谷胱甘肽过氧化物酶是重要的含硒抗氧化蛋白，通过氧化谷胱甘肽来降低细胞内 H_2O_2 的含量，保护细胞膜，并加强维生素 E 的抗氧化作用。硒蛋白 P 是血浆中的主要硒蛋白，可表达于各种组织，如动脉内皮细胞和肝血窦内皮细胞。硒蛋白 P 是硒的转运蛋白，也是内皮系统的抗氧化剂。硫氧还蛋白还原酶参与调节细胞内氧化还原过程，刺激正常和肿瘤细胞的增殖，并参与 DNA 合成的修复机制。碘甲腺原氨酸脱碘酶可激活或去激活甲状腺激素。这是硒通过调节甲状腺激素水平来维持机体生长、发育与代谢的重要途径。此外，硒还参与辅酶 Q 和辅酶 A 的合成。

缺硒可引发很多疾病，如糖尿病、心血管疾病、神经变性疾病、某些癌症等。世界上不同地区的土壤中含硒量不同，影响食用植物中硒的含量，从而影响人类硒的摄取量。克山病便是由于地域性生长的庄稼中含硒量低引起的地方性心肌病。

由于硒的抗氧化作用，服用硒（如 200μg/日）或含硒制剂可以明显降低某些癌症（如前列腺癌、肺癌、大肠癌）的危险性。

硒过多也会引起中毒症状。

六、碘是甲状腺激素的组成成分

成人体内含碘（iodine）30～50mg，其中约 30%集中在甲状腺内，用于合成甲状腺激素。60%～80%以非激素的形式分散于甲状腺外。成人每日需碘 100～300mg。碘的吸收部位主要在小肠。碘主要随尿排出，尿碘约占总排泄量的 85%，其他由汗腺排出。

碘在人体内的一个主要作用是参与甲状腺激素的合成。缺碘可引起地方性甲状腺肿，严重可致发育停滞、痴呆，如胎儿期缺碘可致呆小病；若摄入碘过多又可致高碘性甲状腺肿，表现为甲状腺功能亢进及一些中毒症状。

碘的另一重要功能是抗氧化作用。在含碘细胞中有 H_2O_2 和过氧脂质存在时，碘可作为电子供体发挥作用。碘可与活性氧竞争细胞成分和中和羟自由基，防止细胞遭受破坏。碘还可以与细胞膜多不饱和脂肪酸的双键接触，使之不易产生自由基。因此，碘在预防癌症方面有一定的积极作用。

七、钴以维生素 B_{12} 的形式发挥作用

体内的钴（cobalt）主要以维生素 B_{12} 的形式发挥作用。人体对钴的最小需要量为 1μg。来自食物中的钴必须在肠内经细菌合成维生素 B_{12} 后才能被吸收利用。钴主要从尿中排泄。钴的缺乏可使维生素 B_{12} 缺乏，而维生素 B_{12} 缺乏可引起巨幼红细胞性贫血等疾病。由于人体排钴能力强，很少有钴蓄积的现象发生。

八、氟与骨、牙的形成与钙磷代谢密切相关

成人体内含氟（fluorine）约 2～6g，其中 90％分布于骨、牙中，少量存在于指甲、毛发及神经肌肉中。氟的生理需要量每日为 0.5～1.0mg。氟主要从胃肠和呼吸道吸收，入血后与球蛋白结合，小部分以氟化物形式运输。血中氟含量约为 20μmol/L。氟主要从尿中排泄。

氟与骨、牙的形成及钙磷代谢密切相关。氟可被羟基磷灰石吸附，生成氟磷灰石，从而加强对龋牙的抵抗作用。缺氟可致骨质疏松，易发生骨折；牙釉质受损易碎。氟过多可引起骨脱钙和白内障，并可影响肾上腺、生殖腺等多种器官的功能。

老年人的特殊营养需求

随着老龄社会的到来，老年人的营养备受关注。老年人有其特殊的代谢特点。例如，维生素 B_6 的吸收和利用随年龄的增长而降低。老年人胃产生内因子的能力下降，容易发生维生素 B_{12} 缺乏。同型半胱氨酸生成甲硫氨酸和半胱氨酸时需要叶酸、维生素 B_{12} 和维生素 B_6 的参与，这些维生素的缺乏可导致高同型半胱氨酸血症，而后者是动脉硬化的危险因子。老年人不爱晒太阳可使皮肤维生素 D_3 的生成减少，同时随年龄的增长，肾羟化 25-OH-D_3 生成 1,25-$(OH)_2D_3$ 的能力减弱。这些均可助长骨质疏松。老年人体内铬转化为铬调蛋白（chromodulin）的能力下降，与成年人糖尿病密切相关。此外，老年人锌的摄取和吸收减少导致味觉迟钝、皮炎和免疫系统减弱。维生素 A 的吸收随年龄而增加，而肝清除维生素 A 的能力降低，所以老年人不但对维生素 A 的需要量下降，而且还要防止维生素 A 中毒的发生。

九、铬与胰岛素的作用关系密切

整粒的谷类、豆类、海藻类、肉类和乳制品是铬（chromium）的最好来源。人体每日摄入铬 30～40μg 便足以满足人体的需要。铬是铬调素（chromodulin）的组成成分。铬调素是一种分子量约 1500 的多肽，由甘氨酸、半胱氨酸、谷氨酸和天冬氨酸等 4 种氨基酸残基组成，每分子可紧密结合 4 个铬离子（Cr^{3+}）。铬调素通过促进胰岛素与细胞受体的结合，增强胰岛素的生物学效应。铬缺乏主要表现在胰岛素的有效性降低，造成葡萄糖耐量受损，血清胆固醇和血糖上升。动物实验证明，铬还具有预防动脉硬化和冠心病的作用，并为生长发育所需要。

小 结

维生素是人体正常生命活动所必需的一组小分子有机营养物质，机体不能合成或合成量不足，必须靠食物供给，缺乏时会发生维生素缺乏病。根据其溶解性，维生素分为脂溶性和水溶性两大类。脂溶性维生素有维生素 A、D、E 和 K。动物性食物中维生素 A 含量较多，而β-胡萝卜素则源于多种植物。视黄醛参与视循环，缺乏时可引起夜盲症。视黄酸对组织细胞的基因表达和组织分化具有重要调节作用，维持上皮组织的正常形态与生长。维生素 A 缺乏还可引起上皮角化和眼干燥症。维生素 D_3 经肝和肾的羟化作用生成其活化型 1,25-$(OH)_2D_3$，主要作用于小肠和骨，维持血钙正常水平，缺乏则导致佝偻病和骨软化症。紫外线照射可促使皮肤合成维生素 D_3。维生素 E 是体内最重要的脂溶性抗氧化剂，还与细胞信号转导与基因调节有关。维生素 K 作为羧化酶的辅助因子参与包括凝血因子在内的一些 Gla 蛋白翻译后的修饰工作。水溶性维生素有 B 族维生素和维生素 C，它们多以辅酶形式发挥作用。硫胺素是α-酮酸氧化脱羧酶及磷酸戊糖途径中转酮酶的辅酶。核黄素和尼克酰胺分别是氧化还原反应中重要的辅酶。FMN 和 FAD 是黄素蛋白的辅基；而 NAD^+ 和 $NADP^+$ 是多种脱氢酶的辅酶。泛酸存在于辅酶 A 和 ACP 中，在反应中携带并传递脂酰基。磷酸吡哆醛是转氨酶和氨基酸脱羧酶的辅酶。生物素为羧化酶的辅酶，起固定 CO_2 的作用。维生素 B_{12} 和叶酸在一碳单位和甲硫氨酸代谢中具有重要地位，直接影响核酸的代谢。维生素 B_6、叶酸与维生素 B_{12} 由于影响同型半胱氨酸的代谢，与动脉硬化、血栓生成与高血压有一定的关系。维生素 C 是含铜羟化酶和含铁羟化酶的辅酶，除直接影响酪氨酸和胆固醇的代谢外，还影响胶原翻译后的修饰。维生素 C 缺乏时可引起坏血病。维生素 C 是水溶性抗氧化剂，对于维持谷胱甘肽的还原性有一定的作用。

钙与磷除了作为骨的主要组成外，还具有许多重要的生理功能，血钙与血磷相对恒定，PTH、CT 和 1,25-$(OH)_2D_3$ 调节钙磷代谢。微量元素是指人体每日需要量在 100mg 以下的元素。铁是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素系统、呼吸链的主要复合物、过氧化物酶及过氧化氢酶等的重要组成部分，在气体运输、生物氧化和酶促反应中均发挥重要的作用。运铁蛋白和铁蛋白分别是铁的运输和储存形式。铁的缺乏可引起小细胞低血色性贫血。锌是含锌金属酶和许多锌指蛋白的组成成分。铜是体内多种酶的辅基。锰是多种酶的组成成分和激活剂。硒在体内以硒半胱氨酸（selenocysteine）的形式存在于硒蛋白中，具有抗氧化、维持机体生长、发育与代谢的重要功能。碘参与甲状腺激素的合成。钴主要以维生素 B_{12} 的形式发挥作用。氟与骨、牙的形成及钙磷代谢密切相关。铬作为铬调素的组成成分增强胰岛素的生物学效应。

（赵宝昌）

第十九章　糖蛋白、蛋白聚糖和细胞外基质

糖类是自然界分布最广的有机分子。生物体内除了单糖、多糖等外，糖类还可与蛋白质、脂等分子结合成糖复合物。糖复合物（glycoconjugate）是体内又一类生物大分子，在体内发挥着其他分子不可替代的作用。糖复合物主要包括糖蛋白（glycoprotein）和蛋白聚糖（proteoglycan）和糖脂（glycolipids），本章主要讨论前两者。就结构而论，糖蛋白和蛋白聚糖都由共价键相连接的蛋白质和聚糖（glycan）两部分组成。大多数真核细胞都能合成一定数量和类型的糖蛋白和蛋白聚糖，它们主要分布于细胞表面、细胞内分泌颗粒和细胞核内，也可被分泌出细胞，构成细胞外基质成分。糖蛋白分子中的聚糖占分子量2%～10%，也有少数高达50%，但一般讲，蛋白质重量百分比大于聚糖。而蛋白聚糖中聚糖所占重量在一半以上，甚至高达95%，以致大多数蛋白聚糖中聚糖的分子量高达10万以上。由于糖蛋白和蛋白聚糖的聚糖结构迥然不同，因此两者在合成途径和功能上存在显著差异。

第一节　糖　蛋　白

一、糖蛋白糖链的结构

许多细胞膜蛋白、分泌蛋白和细胞外基质等都是糖蛋白。如属于膜蛋白的有血型抗原、组织相容性抗原，激素和生长因子的膜受体等；属于分泌性糖蛋白的有胃黏蛋白、运铁蛋白、凝血酶原、纤溶酶原、血清类黏蛋白等；作为细胞外基质的糖蛋白有胶原蛋白、纤连蛋白和层粘蛋白等。糖蛋白的糖基化主要有N-连接和O-连接型方式，但近年来还存在另一种可逆的单个糖基的糖基化修饰，为β-N-乙酰氨基葡萄糖糖基化修饰。

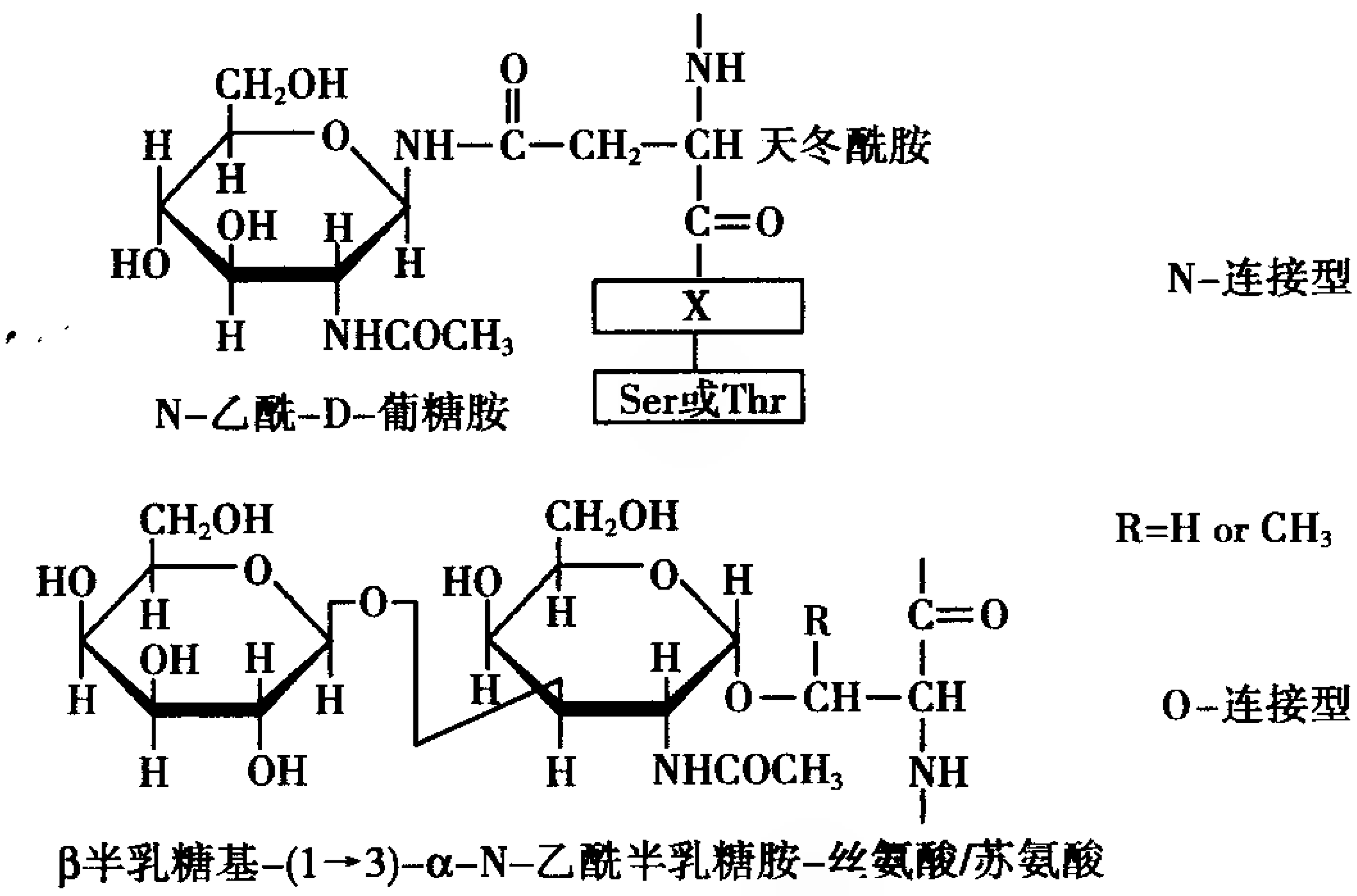
（一）糖蛋白聚糖分为N-连接型和O-连接型两种

组成体内众多糖蛋白分子中聚糖的单糖仅有7种，即葡萄糖（glucose，Glc）、半乳糖（galactose，Gal）、甘露糖（mannose，Man）、N-乙酰半乳糖胺（N-acetylgalactosamine，GalNAc）、N-乙酰葡糖胺（N-acetylglucosamine，GlcNAc）、岩藻糖（fucose，Fuc）和N-乙酰神经氨酸（N-acetylneuraminic acid，NeuAc）。由这些单糖构成的各种各样的聚糖可经两种方式与蛋白部分连接，即N连接聚糖（N-linked glycan）和O-连接聚糖（O-linked glycan），因此糖蛋白也相应分成N-连接糖蛋白和O-连接糖蛋白（图19-1）。值得指出的是，N-连接聚糖和O-连接聚糖可以单独存在或同时存在于同一个糖蛋白分子中。

（二）N-连接糖蛋白的糖基化位点为Asn-X-Ser/Thr

N-连接糖蛋白聚糖中的N-乙酰葡糖胺与多肽链中天冬酰胺残基的酰胺氮以共价键连接，形成N-连接糖蛋白。但是并非糖蛋白分子中所有天冬酰胺残基都可连接聚糖。只有特定的氨基酸序列，即Asn-X-Ser/Thr（其中X可以是脯氨酸以外的任何氨基酸）3个氨基酸残基组成的序列子才有可能，这一序列子被称为糖基化位点。1个糖蛋白分子可存在若干个Asn-X-Ser/Thr序列子，这些序列子只能视为潜在糖基化位点，能否连接上聚糖还取决于周围的立体结构等众多因素。

值得指出的是，不同种属、组织的同一种糖蛋白的N-连接聚糖的含量和结构可以不同。即使是同一组织中的某种糖蛋白，不同分子的同一糖化位点的N-连接聚糖结构也可

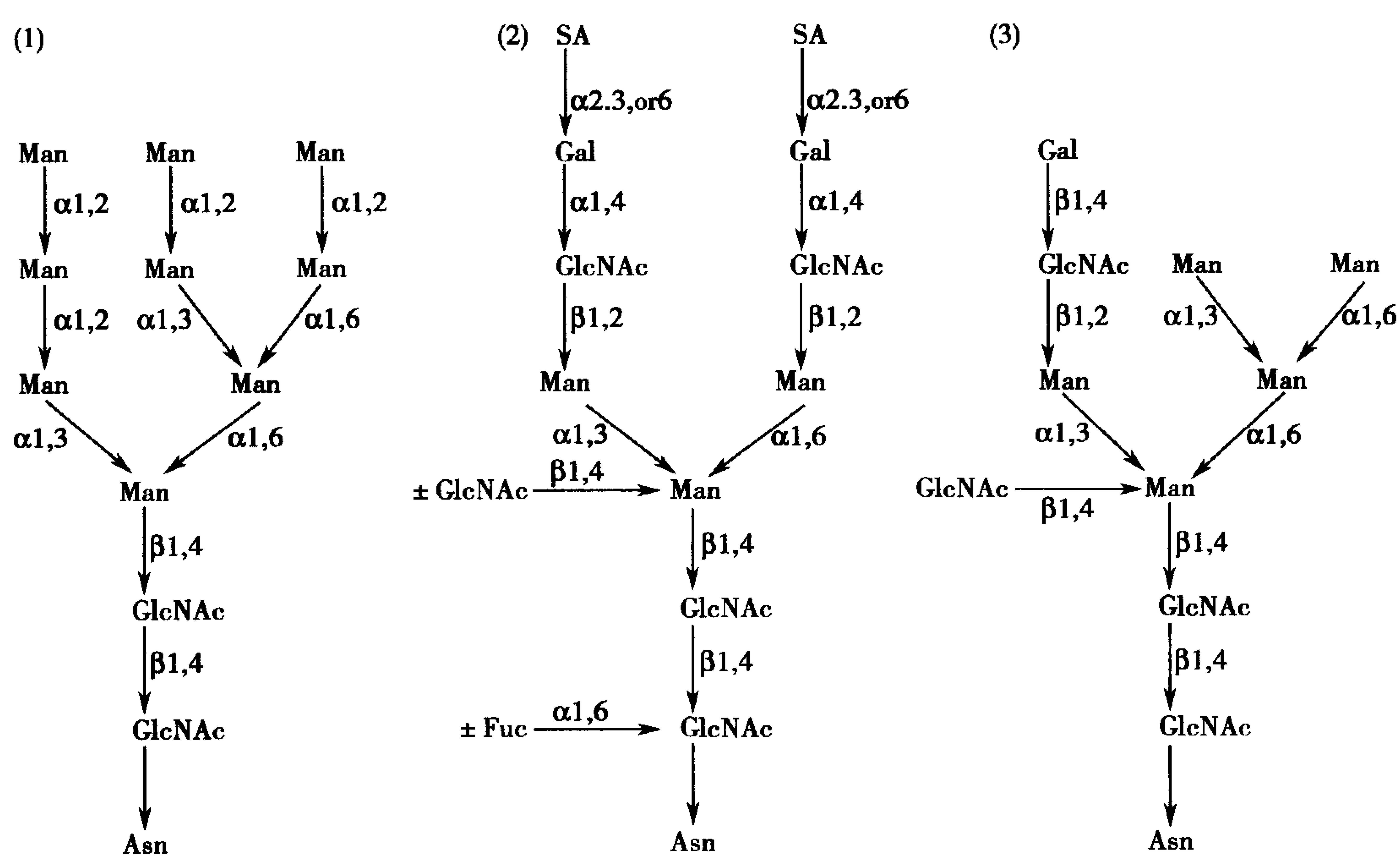


●图 19-1　糖蛋白糖链的 N-连接型和 O-连接型

以不同，这种聚糖结构的不均一性称为糖形（glycoform）。

（三）N-连接聚糖可分为 3 型

糖蛋白的糖链一般含有 10～15 个单糖基，理论上计算会产生巨大数量的异构体，可见其含的生物信息量之大。但糖链可变的区域只是糖链其中的一部分。根据结构可将 N-连接聚糖分为 3 型：①高甘露糖型；②复杂型；③杂合型。这 3 型 N-连接聚糖都有一个 5 糖核心（图 19-2）。高甘露糖型在核心 5 糖上连接了 2～9 个甘露糖，复杂型在核心 5 糖上可连接二、三、四或五个分支聚糖，宛如天线状，天线末端常连有 N-乙酰神经氨酸。杂合型则兼有两者的结构。



●图 19-2　N-连接型糖链的分型

Man：甘露糖　GlcNAc：N-乙酰葡萄糖胺　SA：唾液酸　Gal：半乳糖　Fuc：岩藻糖　Asn：天冬氨酸

±：为可有可无之糖基

（四）N-连接聚糖的合成是以长萜醇作为聚糖载体

N-连接聚糖的合成是一个共翻译过程，即在粗面内质网的核糖体上合成糖蛋白的肽链时，一旦出现 Asn-X-Ser/Thr 序列时，即有可能开始糖基化。N-连接聚糖可被位于网腔膜

结构上的加工酶修剪加工成高甘露糖型，再进入高尔基体。N-连接聚糖合成的起始是在内质网上以长萜醇作为聚糖载体进行的（图 19-3），先合成含 14 个糖基的寡糖链，然后转移至肽链的糖基化位点，进一步在内质网和高尔基体进行加工而成。每一步加工都由特异的糖基转移酶或糖苷酶催化完成，糖基必须活化为 UDP 或 GDP 的衍生物。14 糖聚糖在内质网经 α-葡萄糖苷酶Ⅰ和Ⅱ切去 3 个 Glc，α-甘露糖苷酶切去 1 个 Man 后形成高甘露糖型。高甘露糖型再转入高尔基体，α-甘露糖苷酶Ⅰ切去 3 个 Man，N-GlcNAc 转移酶（GnTⅠ）接一个 GlcNAc，形成杂合型糖链。杂合型糖链在高尔基体中再被 α-甘露糖苷酶Ⅱ切去 2 个 Man，GnTⅡ接上第二个 GlcNAc。Gal 转移酶（GT）添加 Gal，SA 转移酶（ST）添加 SA，完成酸性两天线复杂型糖链。N-连接聚糖加工是由高甘露糖型转化为杂合型再到复杂型。

三、四天线是在 7 糖二天线阶段接受 GnT-IV 或 V 的作用分别形成含 8 个糖基的 $C_{2,4}C_2$、$C_2C_{2,6}$三天线复杂 N-连接糖链。GnT 是一组决定 N-糖链天线数的关键酶。$\beta_{1,4}$GalT 将 Gal 转移至 GlcNAc 外侧。$\beta_{1,3}$GnTi 与 $\beta_{1,4}$GalT 交替作用，使外链不断延伸。ST 6N（$\alpha_{2,6}$）、ST 3N（$\alpha_{2,3}$）、ST 8N（$\alpha_{2,8}$）终止外链合成。GalNAcT 和 GalNAc-4-磺基转移酶相继催化合成外侧 4 位硫酸化的 GalNAc 结构。

（五）O-连接糖蛋白

1. O-连接聚糖结构　聚糖中的 N-乙酰半乳糖胺与多肽链的丝氨酸或苏氨酸残基的羟基以共价键相连而形成 O-连接糖蛋白。它的糖基化位点的确切序列子还不清楚，但通常存在于糖蛋白分子表面丝氨酸和苏氨酸比较集中且周围常有脯氨酸的序列中。O-连接聚糖常由 N-乙酰半乳糖胺与半乳糖构成核心二糖，核心二糖可重复延长及分支，再连接上岩藻糖、N-乙酰葡糖胺等单糖。

2. O-连接聚糖的合成　与 N-连接聚糖合成不同，O-连接聚糖合成是在多肽链合成后进行的，而且不需聚糖载体。在 GalNAc 转移酶作用下，将 UDP-GalNAc 中的 GalNAc 基转移至多肽链的丝氨酸（或苏氨酸）的羟基上，形成 O-连接，然后逐个加上糖基，每一种糖基都有其相应的专一性转移酶。整个过程在内质网开始，到高尔基体内完成。

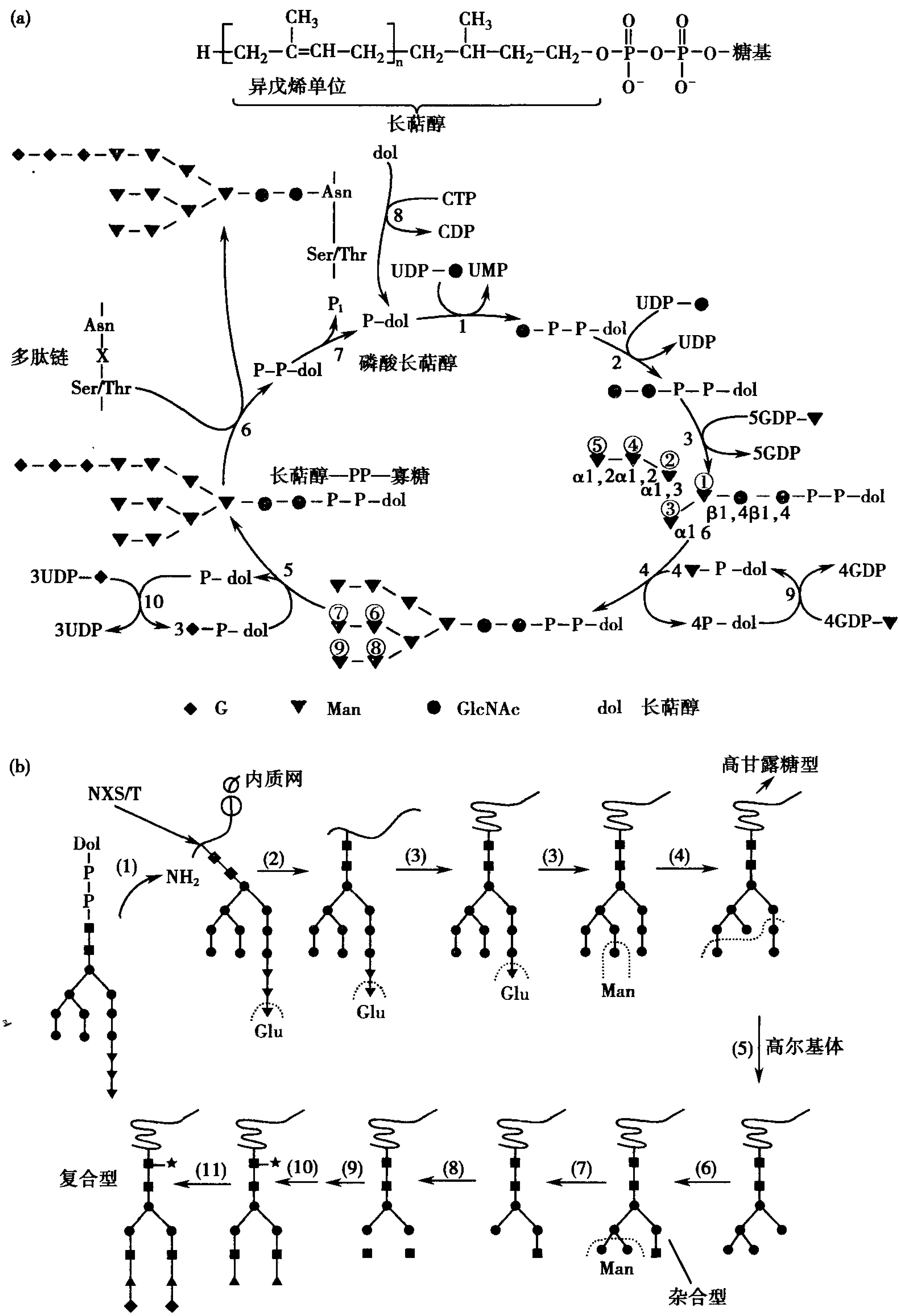
（六）蛋白质 β-N-乙酰氨基葡萄糖基化是可逆的单糖基修饰

蛋白质糖基化修饰除 N-聚修饰，O-聚修饰外，还有近年来发现的 β-N-乙酰氨基葡萄糖（β-N-acetylglucosamine，O-GlcNAc）糖基化修饰，主要发生于膜蛋白和分泌蛋白。蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化修饰，是在 O-GlcNAc 糖基转移酶（O-GlcNAc transferase，OGT）作用下，将 β-N-乙酰氨基葡萄糖以共价键方式结合于蛋白质的 Ser/Thr 残基上。这种糖基化修饰与 N-或 O-聚糖修饰不同，不在内膜（如内质网、高尔基体）系统中进行，主要存在于细胞质或细胞核中。

蛋白质在 O-GlcNAc 糖基化后，其解离需要特异性的 β-N-乙酰氨基葡萄糖酶（O-GlcNAcase）作用，O-GlcNAc 糖基化与去糖基化是个动态可逆的过程。糖基化后，蛋白肽链的构象将发生改变，从而影响蛋白质功能。可见，蛋白质在 OGT 与 O-GlcNAcase 作用下的这种糖基化过程与蛋白质磷酸化调节具有相似特征。此外，O-GlcNAc 糖基化位点也经常位于蛋白质 Ser/Thr 磷酸化位点处或其邻近部位。糖基化后即会影响磷酸化的进行，反之亦然。因此，有人推测，O-GlcNAc 糖基化与蛋白质磷酸化是一种相互拮抗的修饰行为，共同参与信号通路调节过程。

（七）糖组学

糖组学（glycomics）是后基因组时代的重要领域之一，它比基因组学、蛋白组学显得更为复杂。糖组（Glycome）是指一种细胞或一个生物体中全部聚糖的种类；而糖组学则



●图 19-3　长萜醇-P-P 聚糖的合成（a）及 3 型 N-聚糖的加工过程（b）

包括聚糖种类、结构鉴定、糖基化位点分析、蛋白质糖基化的机制和功能等研究，是对蛋白质与聚糖间的相互作用和功能的全面分析。糖组学研究的开展促进了对第三类生物信息大分子——聚糖在生命活动中作用的阐明。

近年来，糖组学的研究技术有了一定的发展，包括糖捕捉法、糖微阵列法和基质辅助激光解吸离子化飞行质谱等，使糖链鉴定和糖基化位点分析正逐步向高通量、高灵敏度的方向发展，为糖蛋白质组学技术不断成熟与完善，从而为揭开更多的聚糖与生命活动的关系奠定了基础。

二、糖蛋白分子中聚糖的功能

已知体内的蛋白质至少有 1/3 为糖蛋白，执行着不同的功能，但长期以来对糖蛋白中聚糖的功能所知甚少。近年随聚糖功能研究方法的发展，对聚糖的功能也有所了解。聚糖不但能影响蛋白部分的构象、聚合、溶解及降解，还参与糖蛋白的相互识别和结合等，这些作用是蛋白质和核酸所不能取代的。

（一）聚糖可影响糖蛋白生物活性

一般来说，去除聚糖的糖蛋白，容易受蛋白酶水解，说明聚糖可以保护肽链，延长半衰期。不少酶属于糖蛋白，若去除聚糖，并不影响酶的活性，但也有些酶的活性依赖其聚糖，如 β-羟-β-甲戊二酰辅酶 A（HMGCoA）还原酶去聚糖后其活性降低 90%以上，脂蛋白脂酶 N-连接聚糖的核心 5 糖为酶活性所必需。但蛋白质的聚糖也可起屏障作用，影响糖蛋白的作用，如去除寡糖链的糖蛋白易受蛋白酶水解，有些酶的活性依赖其寡糖链。聚糖覆盖于蛋白质表面，防止蛋白质部分受蛋白酶水解。一个单糖可覆盖 0.6nm 长度的表面积；聚糖还可以避免蛋白质中抗原决定簇被免疫系统识别而产生抗体。

免疫球蛋白 G（IgG）也是 N-连接糖蛋白，其聚糖主要存在于 Fc 段。IgG 的聚糖与 IgG 结合于单核细胞或巨噬细胞上的 Fc 受体，对补体 C1q 的结合和激活以及诱导细胞毒等过程有关。若 IgG 去除聚糖，其铰链区的空间构象遭到破坏，上述与 Fc 受体和补体的结合功能就丢失。

（二）糖蛋白聚糖加工可参与新生肽链折叠

不少糖蛋白的 N-连接聚糖参与新生肽链的折叠并维持蛋白质正确的空间构象。如用核酸点突变的方法，去除某一病毒 G 蛋白的两个糖基化位点后，此 G 蛋白就不能形成正确的链内二硫键而错配成链间二硫键，空间构象也发生改变。

糖蛋白的糖基化与肽链的折叠及分拣密切相关。有时新生肽链在核糖体上合成后，并不具有特定的空间构象，当然也不表现任何生物活性。因此有人认为，成熟蛋白质的立体结构的信息不全在 DNA 上，有一半是在新生肽链的折叠过程中由环境和其他一些蛋白质赋予的。内质网是一个多用途的装备了分子伴侣和折叠酶的蛋白质加工厂（分子机器），内质网的蛋白正确折叠的质量控制就是在分子伴侣和折叠酶的作用下完成的。正确折叠的蛋白随后被输出到高尔基体，错误折叠的蛋白或者延误一定时间没有被进一步加工的蛋白被留在内质网，然后被降解。

（三）糖蛋白聚糖可参与维系亚基聚合

具有功能的糖蛋白二聚体，往往依靠糖-蛋白或糖-糖相互作用维系亚基的聚合和构象。如整合蛋白 α_5 和 β_1 亚基之间形成二聚体依赖 α_5 和 β_1 糖链的存在和类型。免疫球蛋白 Ig 中，Fc 段的 CH2 结构域的二条重链 297 位 Asn 有一条二天线 N-糖链，依赖糖链与对侧糖链或肽链的疏水位点互相作用，维持 Fc 段两条重链的相互靠拢。运铁蛋白受体有 3 个 N-连接聚糖，分别位于 Asn251，Asn317 和 Asn727。已发现 Asn727 与肽链的折叠和运输密

切相关，Asn251 连接有三天线复杂型聚糖，此聚糖对于形成正常二聚体起重要作用。可见聚糖能影响亚基聚合。

（四）聚糖对蛋白质在细胞内的分拣、投送和分泌中的作用

有些蛋白质的投送信号存在于肽链内，但有些是与其糖链有关。衣霉素是一种抑制 G 寡糖从头合成的抑制剂。用衣霉素处理细胞可以阻止细胞 N 聚糖从头合成，最终导致很多定位于膜上的糖蛋白减少。原因大概如下：①无糖部分的蛋白，折叠异常，暴露内质网潴留信号，不能到达高尔基体继续加工，而易被蛋白酶体降解；②无糖部分的蛋白的分泌投送受影响。

（五）糖蛋白聚糖具有分子间的识别作用

聚糖中单糖间的连接方式有 1→2，1→3，1→4，1→6 几种，又有 α 和 β 之分，这种结构的多样性是聚糖起到分子识别作用的基础。

猪卵细胞透明带中分子量为 5.5 万的 ZP-3 蛋白，含有 O-连接聚糖，能识别精子并与之结合。受体与配体识别和结合也需聚糖的参与。如整合蛋白与其配体纤连蛋白的结合，依赖于完整的整合蛋白 N-连接聚糖，若用聚糖加工酶抑制剂处理 K562 细胞，使整合蛋白聚糖改变成高甘露糖型或杂合型，均可降低与纤连蛋白识别和结合的能力。

红细胞的血型物质含糖达 80%～90%。ABO 系统中血型物质 A 和 B 均是在血型物质 O 的聚糖非还原端分别加上 GalNAc 或 Gal，仅一个糖基之差，使红细胞能分别识别不同的抗体，产生不同的血型，可见聚糖功能之奇妙。

凝集素（lectin）是一类非抗体的糖蛋白，能专一性地识别糖类，并以非共价键的方式相结合，具有凝集细胞和沉淀聚糖的作用，因而参与了细胞与细胞、细胞与糖蛋白的识别与结合。细菌表面存在各种凝集素样蛋白，可识别人体细胞表面的聚糖结构而侵袭细胞。

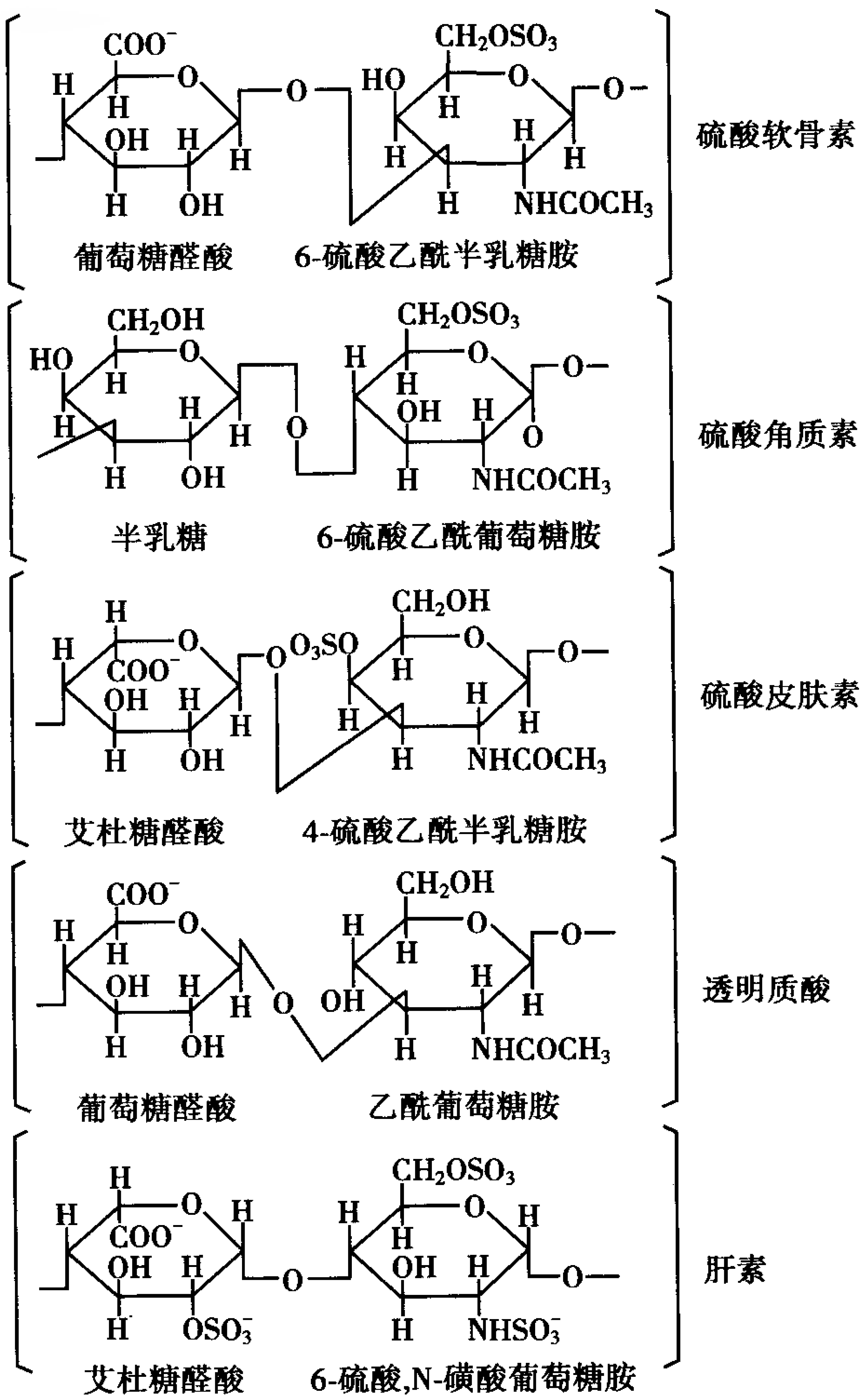
细胞表面糖复合物的聚糖还能介导细胞-细胞的结合。白细胞表面存在一类黏附分子称选凝蛋白(selectin)，能识别并结合存在于内皮细胞表面糖蛋白分子中的特异聚糖结构，白细胞以此与内皮细胞黏附，进而通过其他黏附分子的作用，使白细胞移动并完成出血管的过程。

第二节　蛋白聚糖

糖胺聚糖和蛋白聚糖是细胞外基质的重要成分，维系着细胞之间的联系。而蛋白聚糖又是一类非常复杂的大分子糖复合物，主要由糖胺聚糖共价连接于核心蛋白所组成。一种蛋白聚糖可含有一种或多种糖胺聚糖。糖胺聚糖是由二糖单位重复连接而成，不分支。由于糖胺聚糖的二糖单位必含有糖胺而得名，可以是葡糖胺或半乳糖胺。二糖单位中除了 1 个是糖胺外，另 1 个是糖醛酸，可以是葡糖醛酸或艾杜糖醛酸。除糖胺聚糖外，蛋白聚糖还含有一些 N-或 O-连接聚糖。核心蛋白种类颇多，加之核心蛋白相连的糖胺聚糖链的种类、长度以及硫酸化的程度等复杂因素，使蛋白聚糖的种类更为繁多。

一、糖胺聚糖是含己糖醛酸和己糖胺的重复二糖单位

糖胺聚糖（glycosaminoglycan，GAG）曾称为黏多糖、氨基多糖和酸性多糖等。体内重要的糖胺聚糖有 6 种：硫酸软骨素类（chondroitin sulfates）、硫酸皮肤素（dermatan sulfate）、硫酸角质素（keratan sulfate）、透明质酸（hyaluronic acid）、肝素（heparin）和硫酸类肝素（heparan sulfate）。除透明质酸外，其他的糖胺聚糖都带有硫酸。它们的二糖单位分别为：



硫酸软骨素的二糖单位由N-乙酰半乳糖胺和葡糖醛酸组成，最常见的硫酸化部位是N-乙酰半乳糖胺残基的 C_4 和 C_6 位。单个聚糖约有250个二糖单位，许多这样的聚糖与核心蛋白以O-连接方式相连，形成蛋白聚糖。

硫酸角质素的二糖单位由半乳糖和N-乙酰葡糖胺组成。它所形成的蛋白聚糖可分布于角膜中，也可与硫素软骨素共同组成蛋白聚糖聚合物，分布于软骨和结缔组织中。硫酸皮肤素分布广泛，其二糖单位与硫酸软骨素很相似，仅一部分葡糖醛酸为艾杜糖醛酸所取代，所以硫酸皮肤素含有两种糖醛酸。葡糖醛酸转变为艾杜糖醛酸是在聚糖合成后进行，由差向异构酶催化。肝素的二糖单位为葡糖胺和艾杜糖醛酸，葡糖胺的氨基氮和 C_6 位均带有硫酸。肝素合成时都是葡糖醛酸，然后差向异构化为艾杜糖醛酸，并随之进行 C_2 位硫酸化。肝素所连的核心蛋白几乎仅由丝氨酸和甘氨酸组成。肝素分布于肥大细胞内，有抗凝作用。硫酸类肝素是细胞膜成分，突出于细胞外。

透明质酸的二糖单位为葡糖醛酸和N-乙酰葡糖胺。1个透明质酸分子可由50000个二糖单位组成，但它所连的蛋白部分很小。透明质酸分布于关节滑液、眼的玻璃体及疏松的结缔组织中。

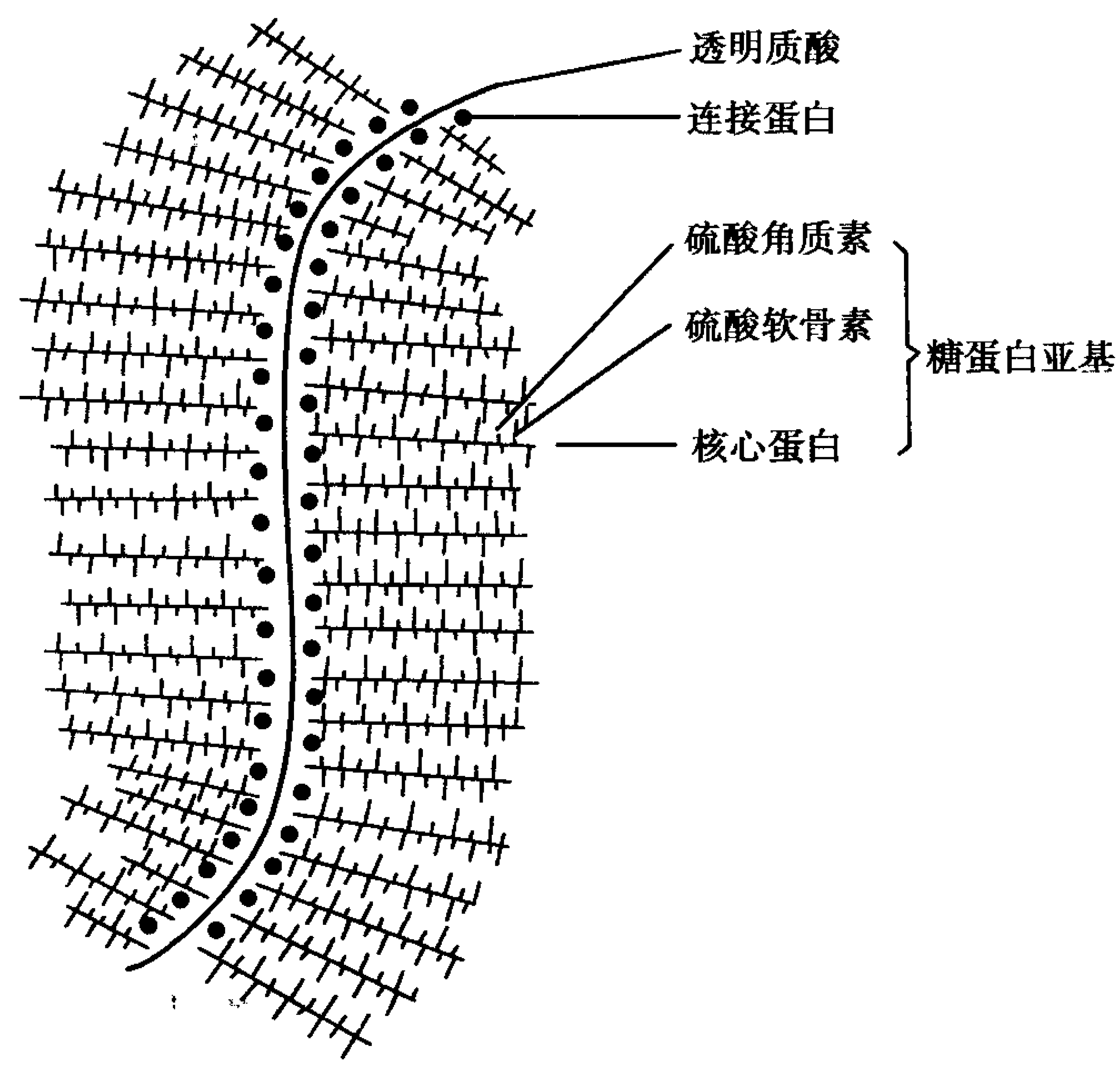
二、核心蛋白均含有结合糖胺聚糖的结构域

蛋白聚糖分子由一条或多条糖胺聚糖和一个核心蛋白共价连接而成。核心蛋白（core

protein）种类繁多，分子量从 2 万到 25 万不等。核心蛋白均含有相应的糖胺聚糖取代结构域，一些蛋白聚糖通过核心蛋白特殊结构域锚定在细胞表面或细胞外基质的大分子中。

蛋白聚糖根据核心蛋白分子量大小、结构以及糖胺聚糖糖链成分，可分为 3 种：①大分子聚集型胞外基质蛋白聚糖；②小分子富含亮氨酸胞外基质蛋白聚糖；③跨膜胞内蛋白聚糖。核心蛋白最小的蛋白聚糖称为丝甘蛋白聚糖（serglycan），含有肝素，主要存在于造血细胞和肥大细胞的贮存颗粒中，是一种典型的细胞内蛋白聚糖。饰胶蛋白（decorin）聚糖的核心蛋白分子量为 3.6 万，富含亮氨酸重复序列的模体，它因能修饰胶原蛋白而得名。黏结蛋白聚糖（syndecan）的核心蛋白分子量为 3.2 万，含有胞质结构域、插入膜质的疏水结构域和胞外结构域，胞外结构域连有硫酸肝素和硫酸软骨素，是细胞膜表面主要蛋白聚糖之一。

蛋白聚糖聚合物（aggrecan）是细胞外基质的重要成分之一，由透明质酸长聚糖两侧经连接蛋白而结合许多蛋白聚糖而成，由于糖胺聚糖上羧基或硫酸根均带有负电荷，彼此相斥，所以在溶液内蛋白聚糖呈瓶刷状（图 19-4）。



●图 19-4 骨骼软骨蛋白聚糖聚合物

三、核心蛋白逐一加上糖基而形成蛋白聚糖

在内质网上，蛋白聚糖先合成核心蛋白的多肽链，多肽链合成的同时即以 O-连接或 N-连接的方式在丝氨酸或天冬酰胺残基上进行聚糖加工。聚糖的延长和加工修饰主要是在高尔基体内进行，以单糖的 UDP 衍生物为供体，在多肽链上逐个加上单糖，而不是先合成二糖单位。每一单糖都有其特异性的糖基转移酶，使聚糖依次延长。聚糖合成后再予以修饰，糖胺的氨基来自谷氨酰胺，硫酸则来自“活性硫酸”或 3′-磷酸腺苷-5′-磷酰硫酸。差向异构酶可将葡糖醛酸转变为艾杜糖醛酸。

四、蛋白聚糖是细胞间基质的重要成分

蛋白聚糖最主要的功能是构成细胞间的基质，在基质中蛋白聚糖与弹性蛋白、胶原蛋白以特异的方式相连而赋予基质以特殊的结构。基质中含有大量透明质酸，可与细胞表面的透明质酸受体结合，影响细胞与细胞的黏附、细胞迁移、增殖和分化等细胞生物学行为。由于蛋白聚糖中的糖胺聚糖是多阴离子化合物，结合 Na^+、K^+，从而吸收水分子，糖的羟基也是亲水的，所以基质内的蛋白聚糖可以吸引、保留水而形成凝胶，容许小分子化合物自由扩散而阻止细菌通过，起保护作用。而有些细菌能分泌透明质酸酶，分解基质而侵入机体。细胞表面有众多类型的蛋白聚糖，大多数含有硫酸肝素，分布广泛，在神经发育、细胞识别结合和分化等方面起到重要的调节作用。有些细胞还存在丝甘蛋白聚糖，它的主要功能是与带正电荷的蛋白酶、羧肽酶及组胺等相互作用，参与这些生物活性分子的贮存和释放。除此之外，各种蛋白聚糖还有其特殊功能。肝素是重要的抗凝剂，能使凝血

酶原失活。肝素能特异地与毛细血管壁的脂蛋白脂肪酶结合，促使后者释放入血。在软骨中硫酸软骨素含量丰富，维持软骨的机械性能。角膜的胶原纤维间充满硫酸角质素和硫酸皮肤素，使角膜透明。新近研究发现，在肿瘤组织中各种蛋白聚糖的合成发生改变，与肿瘤增殖和转移有关。

聚糖作为信息分子：糖密码

主要研究糖复合物结构与功能的糖生物学，是生物化学与细胞生物学中最活跃的领域之一。越来越多的证据表明，特异的聚糖结构被细胞用来编码若干重要的信息，例如糖蛋白的胞内定向转运、细胞与细胞的相互作用、组织与器官发育以及细胞外信号转导等。

现代先进分析技术获得的寡糖和多糖结构，揭示了糖蛋白聚糖结构的复杂性与多样性。其复杂性在于可含有 14 个单糖基之多；存在（1→2）、（1→3）、（1→4）、（1→6）、（2→3）和（2→6）糖苷键连接方式，其中有些键为 α 构型，有些为 β 构型。聚糖常含有分支结构，核酸与蛋白质分子并不含分支。在聚糖结构中可有 20 种不同的单糖，据此可计算得到存在 1.44×10^{15} 个不同结构的六聚糖（hexameric oligosaccharides）的可能性；而 20 种氨基酸形成六肽，仅有 6.4×10^{7} 种（20^6）可能的六肽；4 种单核苷酸，仅有形成 4096 种（4^6）含 6 个单核苷酸的多核苷酸的可能性。聚糖含有如此巨大的信息，不仅可与核酸相媲美，而且在相同分子量所含信息密度上，远超核酸。每一聚糖都有一个独特的能被蛋白质阅读，并与蛋白质相结合的三维空间构象，即糖密码（sugar code）。

第三节 细胞外基质

细胞是生物体的基本组成单位。绝大多数哺乳动物细胞之间存在成分复杂的细胞外基质（extracellular matrix，ECM）。ECM 由 3 类成分组成：①结构蛋白：如胶原、弹性蛋白等；②专一蛋白（specialized protein）：如纤连蛋白、层粘连蛋白和纤维蛋白（fibrillin）等；③蛋白聚糖。这些组分按不同比例形成生物体内多种类型的 ECM，每一类型执行其特定功能。有些组织细胞的间隙极有限，例如皮肤表皮、肌肉细胞等，通常表皮细胞黏着一层很薄的称为基膜（basal laminae）的 ECM 上，基膜含有的胶原可形成二维的网状结构。肾小球基膜宛如一张多孔的滤膜，使血液中的水分子及小分子化合物进入肾小管。而结缔组织中细胞间隙较大并填充着许多 ECM，完成特定的功能。

随着 ECM 在生理和病理过程中的重要作用被发现，ECM 功能的研究已备受重视。绝不可认为 ECM 仅包裹细胞而已，而是细胞完成若干生理功能的必须依赖的物质。已知细胞的形态、运动及分化均与 ECM 密切相关。ECM 在胚胎发育过程中，许多胚胎细胞需迁移并通过 ECM，到达合适的部位而增殖分化。ECM 能结合许多生长因子和激素，给细胞提供众多信号，调节细胞功能。在急、慢性感染性炎症时，ECM 的生化成分发生改变。本节仅就 ECM 的主要成分胶原、纤连蛋白和层粘连蛋白作一结构和功能的介绍。

一、胶原

结缔组织含有若干种具有特殊功能的细胞以及富含蛋白质和多糖的细胞外基质，胶原

(collagen) 是结缔组织的主要蛋白质成分，约占机体总蛋白的 25%，足见其重要性。不同胶原有截然不同的形态和功能。如骨和牙的坚硬结构，主要是含有胶原蛋白和钙磷聚合物，并聚集成特殊的凝结物所致。但胶原蛋白也有柔韧性，形成的胶原纤维具有很强的抗张力作用。皮肤胶原蛋白编织成疏松的纤维网状结构，而血管壁胶原排列成螺旋网状结构，执行着各自的特有功能。几乎所有类型的胶原都是由结缔组织细胞——成纤维细胞所分泌的，但某些上皮细胞也能分泌某些类型的胶原。

(一) 胶原的分子组成和分型

胶原分子能溶于微温的稀酸中，经超速离心后可分得 3 个组分，即 α、β、γ，其中 β 和 γ 组分分别是 α 组分的二聚体和三聚体。α 组分又分为 α_1，α_2，α_3 和 α_4，它们在氨基酸组成上有所不同，但肽链长度近似。

目前胶原至少已发现有 18 型，其中 5 型常见的胶原分子组成及分布列于表 19-1。

表 19-1　5 型胶原蛋白的结构及组织分布

类型	肽链类型	分子形式	成　分	组织分布
Ⅰ	α1(Ⅰ);α2(Ⅰ)	$[\alpha1(\text{I})]_2[\alpha2(\text{I})]$,$[\alpha1(\text{I})]_3$	羟赖氨酸较低 聚糖较少 纤维较宽	肌腱,骨,皮肤,角膜,韧带等 占体内胶原蛋白总量的 90%
Ⅱ	α1(Ⅱ)	$[\alpha1(\text{II})]_3$	羟赖氨酸较高 聚糖较多 纤维较窄	软骨,眼玻璃体,椎间盘
Ⅲ	α1(Ⅲ)	$[\alpha1(\text{III})]_3$	羟赖氨酸较高 羟脯氨酸较高 聚糖较少	血管,肌肉,皮肤,内脏
Ⅳ	α1(Ⅳ);α2(Ⅳ); α3(Ⅳ);α4(Ⅳ); α4(Ⅳ)	$[\alpha1(\text{IV})]_2[\alpha2(\text{IV})]$ 及其他形式	羟赖氨酸较高 聚糖较多	基底膜
Ⅴ	α1(Ⅴ);α2(Ⅴ) α3(Ⅴ)	$[\alpha1(\text{V})]_3$ $[\alpha1(\text{V})]_2[\alpha2(\text{V})]$ $[\alpha1(\text{V})][\alpha2(\text{V})][\alpha3(\text{V})]$	羟赖氨酸较高 聚糖较多	平滑肌培养细胞,胚胎组织 腹膜,胎盘,皮肤,骨

有些组织的胶原蛋白是由 3 条相同的 α 链组成，如软骨中的Ⅱ型胶原，软组织中的Ⅲ型胶原。在同一组织中常存在几种类型的胶原，但常有一种类型占优势。如肌腱、软骨、动脉、基底膜和平滑肌分别以Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ型胶原为主。一种细胞在不同的发育阶段和条件下可以合成不同类型的胶原，如胎儿皮肤成纤维细胞合成Ⅰ和Ⅲ型，随年龄增长，Ⅲ型胶原合成逐渐减少。

(二) 胶原蛋白 C 端非螺旋结构域与内皮抑素

近年来有关胶原蛋白 C 端非螺旋结构域的生物学功能研究发现，ⅩⅧ型胶原蛋白 C 端非螺旋结构域的氨基酸序列含有内皮抑素 (endostatin) 的全部序列，推测组织中的ⅩⅧ胶原蛋白 C 端非螺旋结构域受蛋白酶水解，产生内皮抑素，发挥抑制内皮细胞生长作用。除内皮抑素外，已知的内源性血管生成抑制剂还有休眠蛋白 (restin)、内皮生长抑制蛋白 (vastatin)、肿瘤抑素 (tumstatin)、阻碍蛋白 (arrestin) 和血管能抑素 (canstatin) 等，分别来源于不同胶原蛋白 C 端非螺旋结构域，它们都有显著的抑制血管内皮细胞生长和迁移、抑制肿瘤细胞增殖和迁移等作用，为肿瘤治疗提供了新的途径 (表 19-2)。

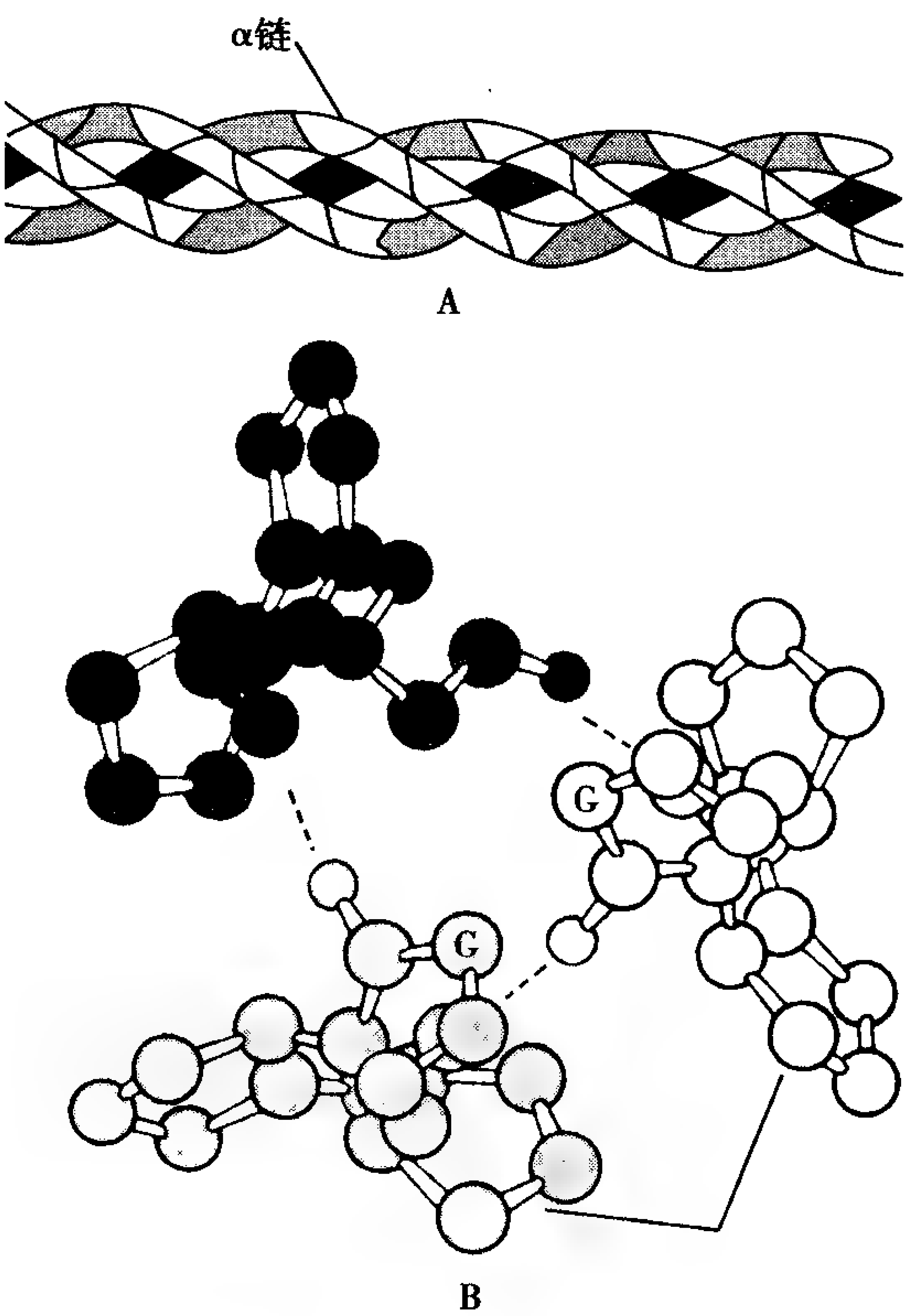
表 19-2 内源性血管生成抑制剂种类和来源

内源性血管生成抑制剂	来源及分子大小
内皮抑素（endostatin）	XⅧ型胶原 C 端非螺旋结构域（184aa）
休眠蛋白（restin）	XV 型胶原 C 端非螺旋结构域（180aa）
内皮生长抑制蛋白（vastatin）	Ⅷ型胶原 C 端非螺旋结构域（164aa）
阻碍蛋白（arrestin）	Ⅳ型胶原 α_1 链 NC1 区（180aa）
肿瘤抑素（tumstatin）	Ⅳ型胶原 α_3 链 NC1 区（180aa）
血管能抑素（canstatin）	Ⅳ型胶原 α_2 链 NC1 区（227aa，Mr 24000）

（三）胶原的氨基酸组成和空间构象特点

任何种系来源的胶原，其氨基酸组成有一与众不同的特征，即甘氨酸占胶原氨基酸残基的 1/3，脯氨酸约占 1/4，尚有羟赖氨酸和羟脯氨酸，属胶原所特有，与胶原分子内交联有关。酪氨酸含量甚少，色氨酸和半胱氨酸则缺如。从营养角度而言，胶原因缺乏色氨酸这一营养必需氨基酸，故为营养不完全蛋白质。

早年从大鼠富含肌腱组织中提纯获得的Ⅰ型胶原中，发现其基本结构单位为三股链，由 2 个 α_1（Ⅰ）和一个 α_2（Ⅰ）组成长 300nm 直径 1.5nm 的蛋白质，即后来被称作的原胶原（tropocollagen）。每一股链含有 1050 个氨基酸残基，以右手旋转的方式，相互绕成三股螺旋（图 19-5）。进一步发现所有的不同类型的胶原均以三股螺旋的方式形成，不同之处仅在于各型的中段三股螺旋形成的多肽片段有所差异，从而折叠成不同的三维空间结构。



●图 19-5 原胶原的三股螺旋结构

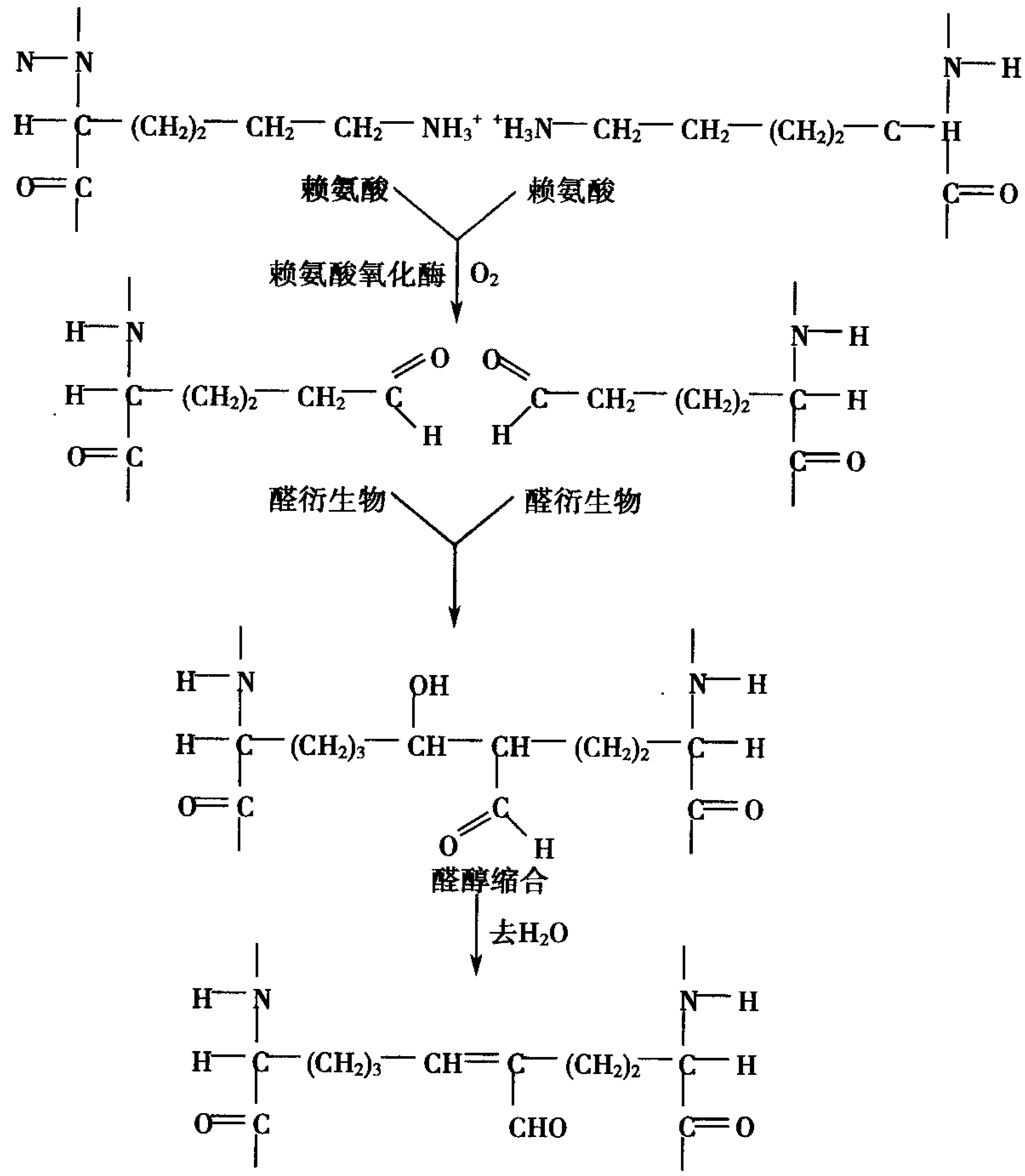
A. 原胶原分子的右手三股螺旋 B. 三股螺旋轴顶面观的棒-球模型 G 为甘氨酸 α 碳原子；点状线为甘氨酸的—NH—与另一链—C═O 形成的氢键

原胶原三股螺旋的每一螺距仅由 3.3 个氨基酸残基所组成，螺旋半径很小，三股螺旋中心的空间只能容纳氢原子，任何比氢大的氨基酸侧链均可能破坏三股螺旋的形成，甘氨酸的存在成为形成三股螺旋的重要条件，通过其—NH—氢原子与相邻肽链的 C═O 基团形成氢键，使三股链相连以形成稳定空间构象（图 19-5）。胶原富含的另两个氨基酸残基是脯氨酸和羟脯氨酸，其结构中具有钢性的吡咯环只能存在于三股螺旋的外侧面。值得指出的是，脯氨酸或羟脯氨酸 N 端所参与的 C—N 键的键角大小，尽管不能形成 α-螺旋，但恰好使所形成的每一股链的空间构象最终能组成三股螺旋。所以胶原蛋白中重复出现的模序 Gly-Pro-X（X 为任一氨基酸）是三股螺旋特定空间构象所依赖的一级结构基础。

（四）胶原微纤维（collagen fibril）

若干具有三股螺旋结构的Ⅰ型原胶原分子通过侧向排列，聚集成直径为 50～200nm 的微纤维。相邻的两个原胶原分子在侧向排列时，两个端点相差约 67nm，分子间有共价键相连，这是由赖氨酸残基侧链末端氨基被氧化成醛基衍生物，然后通过醛醇缩合等过程而形成各种共价键（图 19-6）。此种原胶原分子的侧向连接是Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅴ型胶原若干特

性的分子基础。例如Ⅰ型胶原有强烈的韧性，可耐受强烈张力的伸展而不断裂。在肌腱中，原胶原通过侧向排列形成直径为50nm长度达几个毫米的微纤维（fibril）。微纤维再进一步侧向排列形成胶原纤维（collagen fiber）。正由于胶原纤维具有这样特殊的分子结构，进而产生了能承受巨大外力的能力。



● 图 19-6 原胶原分子侧向共价连接的醛醇交联反应

二、纤连蛋白

纤连蛋白（fibronectin，Fn）是一个多功能的糖蛋白，广泛存在于细胞外基质、基底膜及各种体液（血浆、组织间液、淋巴液、关节腔滑液和羊水）中。体内诸多细胞可合成分泌Fn，成纤维细胞的分泌量尤多，而血浆Fn主要来自肝细胞。

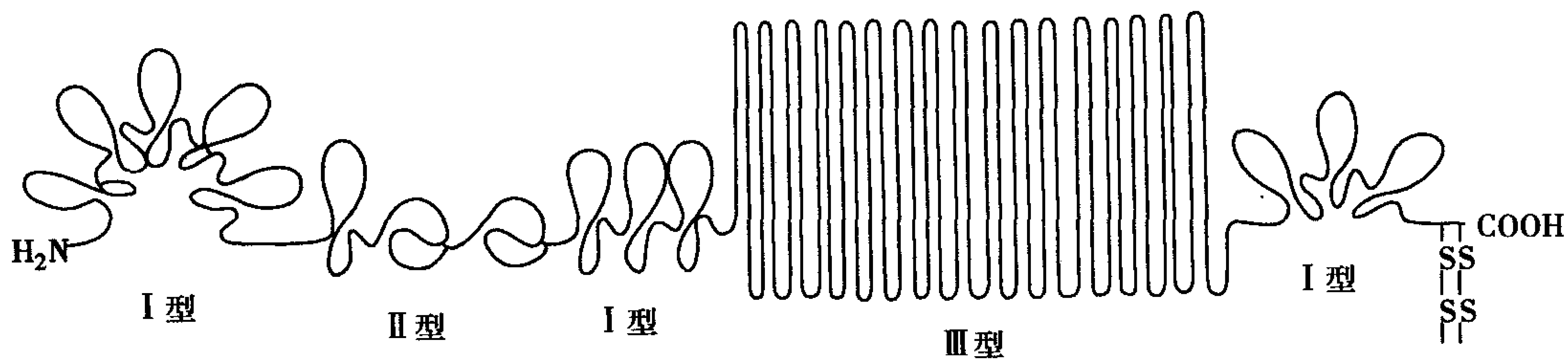
（一）Fn的分子结构

Fn为单一基因的产物，但是由于mRNA的剪接不同，在人类可产生多达10种mRNA。比较鸡、大鼠、牛和人的Fn基因核苷酸序列，结果提示Fn基因是高度保守的。

所有组织来源的Fn，其分子量、基本空间结构及生物学性质均大同小异，由分子量25万左右的单体组成二聚体，也有Fn以多聚体形式存在，甚至在成纤维细胞中尤以多聚体为主。

各种来源的Fn的一级结构由3种不同类型的内在序列同源结构（internal sequence homology）重复出现而构成（图19-7）。这是Fn的特征性结构特征。Ⅰ型同源结构形同

两个相连的指圈，由链内的两个二硫键形成，氨基酸数为 41～52 个。一个 Fn 分子重复出现 12 个 Ⅰ 型同源结构，任何两个 Ⅰ 型同源结构的同源性达 18%～60%。含有 60 个氨基酸残基的Ⅱ型同源结构在 Fn 分子中仅有两个，且前后毗邻，同源性约 50%，每个Ⅱ型同源结构也有两个链内二硫键。每分子 Fn 至少有 16 个Ⅲ型同源结构，分子量较Ⅰ、Ⅱ型为大，由 90 个氨基酸组成，且不含组氨酸残基，其同源性仅为 30%左右。



● 图 19-7 纤连蛋白 3 种同源结构

Fn 的多种生物学活性与其分子中许多抗蛋白酶水解的结构域直接相关，这些结构域已逐个被纯化并作了研究。细胞 Fn 的结构域排列与血浆纤连蛋白相同。

Fn 是一个大分子的糖蛋白，含糖量视组织来源不同而异，通常在 5%～20%范围内，主要为 N-聚糖，每分子 Fn 可有 8～10 条之多，但也可不带聚糖。此外，Fn 分子还含有一条 O-GalNAc 聚糖。现已知道，不同组织来源的 Fn 不仅含糖量不同，而且 N-聚糖结构也相异。现已清楚，Fn 的糖基化与其溶解度和抵抗蛋白酶的作用有关，也影响与胶原结合的亲和力。

（二）Fn 的功能

Fn 广泛分布于各种体液、细胞外基质和细胞中，且聚糖结构也有组织特异性，因而也决定了其功能的多样性。血小板聚集、正常凝血块的形成和组织损伤的修复都离不开血浆 Fn 的作用，感染性炎症的发生及白细胞浸润炎症组织等也有 Fn 参与，Fn 还和细胞的形态、增殖、分化以及个体的发育、生殖等有着密切联系。随着研究的深入，还在不断揭示 Fn 新的作用。

所有 Fn 的功能可以认为是由其介导的细胞与细胞、细胞与基质的相互作用来完成的。从 Fn 分子结构域来看，Fn 对于肝素、胶原、纤维蛋白、蛋白聚糖、肌动蛋白、DNA 乃至细胞等都具有很高的亲和力，与之结合则可继而引发一系列的体液内或细胞内的变化。Fn 对细胞的作用是通过细胞膜表面的 Fn 受体整合蛋白来完成的，Fn 通过分子中细胞结合结构域中的 RGC 模序与其受体结合，而受体将细胞外 Fn 与细胞内侧面的细胞骨架蛋白连成一体，形成信息由外传入胞内的完整体系，从而影响着细胞的生命过程。

三、层粘连蛋白

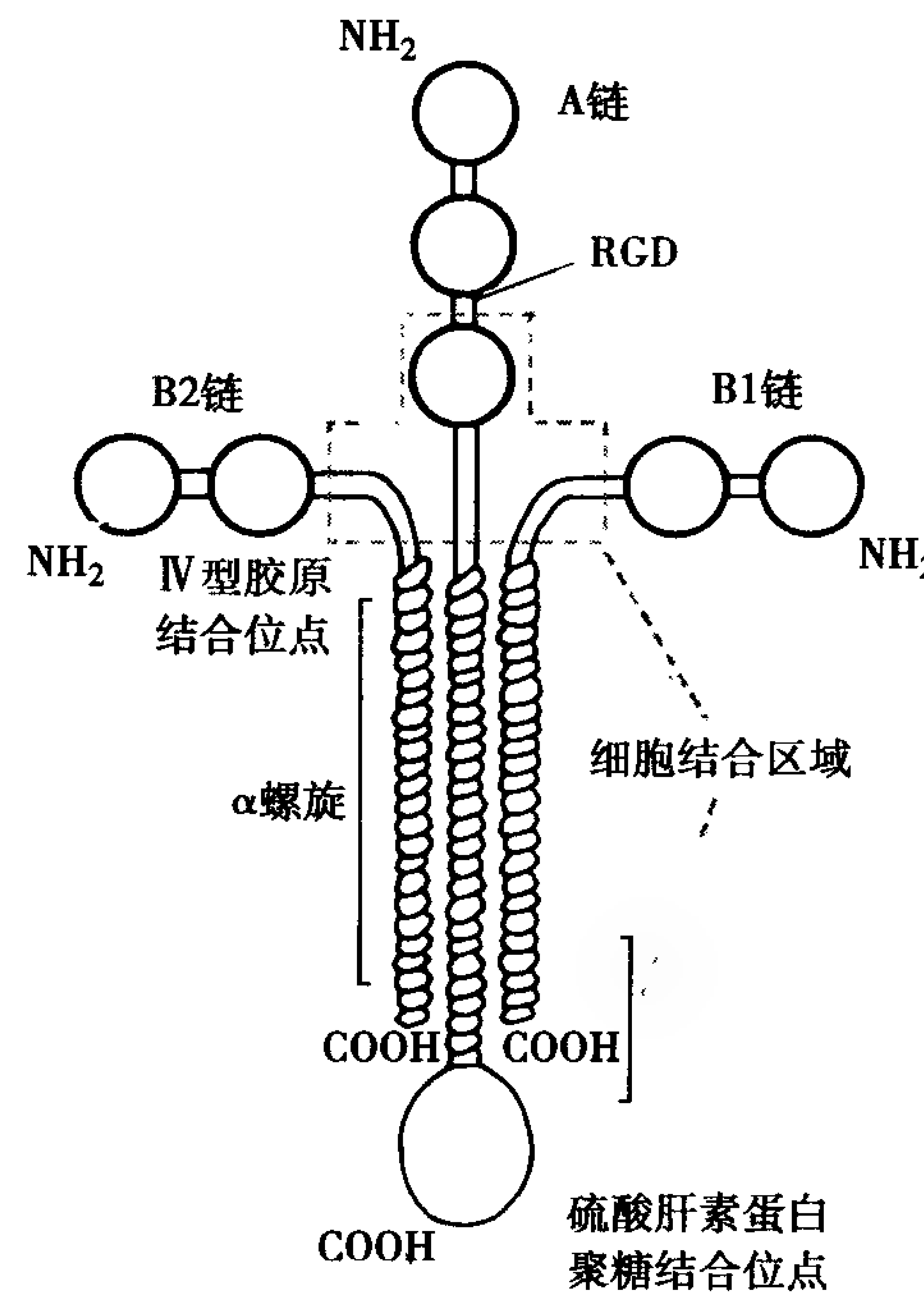
在体内，所有组织的基膜都含有一套常见的蛋白质和蛋白聚糖：Ⅳ型胶原、硫酸肝素蛋白聚糖，巢蛋白（nidogen）和层粘连蛋白（laminin，Ln）。Ln 也称为Ⅳ型胶原基质。

（一）层粘连蛋白分子结构

层粘连蛋白（laminin，Ln）是一种由多结构域构成的糖蛋白，分子量高达 90 万，最初从癌胚细胞株和小鼠肉瘤中分离纯化。现在分子结构已清楚，它是 3 条多肽链（一条 A 链和两条 B 链）通过二硫键连接而成的。电镜显示 Ln 的三条链排列成十字形（图 19-8），A 链 C-端为一庞大的球形结构，为硫酸肝素蛋白聚糖的结合位点，N 端为一小球形结构，

其间还有两个相同大小的球形结构。B链的N-端为一小球，近分子中心处又有一个小球，构成与Ⅳ型胶原结合的区域。三股链共同形成的中间区域可与许多细胞表面的Ln受体结合，此区域包含有RGD片段。

Ln是一个含糖达12%～15%的糖蛋白。应用分子克隆技术，测得小鼠EHS肿瘤中的Ln分子有68个潜在糖化位点，其中40个为实际糖化位点。绝大部分的聚糖为复杂型N-聚糖，结构形式多样，但基本特征为：末端存在半乳糖，也有唾液酸和多聚乙酰氨基乳糖结构。



● 图19-8　层粘连蛋白分子结构

(二) Ln的功能

Ln的生物学功能相当复杂，至今尚未完全明了，一般认为Ln主要与细胞表面的整合蛋白结合，进而产生生理作用。Ln可以介导上皮细胞及内皮细胞黏着于基底膜，从而影响细胞的生长、分化和运动。新近发现，Ln可能与某些疾病，如糖尿病、肾病、类风湿性关节炎和感染等有关，也和抗感染等有关，尤其对于肿瘤细胞的浸润、转移可能有重要作用。

近年来对Ln分子中聚糖的作用研究逐渐深入。早期研究就已发现Ln的聚糖不能阻止蛋白酶对Ln的水解，也不增加Ln与肝素结合强度。现已了解，Ln的聚糖参与若干细胞事件，例如细胞的黏附和铺展，与凝集素样受体（lectin-like receptor）结合、鸡神经干细胞的移动等。而且聚糖的结构改变可引起功能的变化。用衣霉素处理癌胚细胞而获得的无糖Ln，可抑制黑素瘤细胞的铺展，但并不影响其黏附。若用聚糖加工抑制剂使Ln聚糖停留在高甘露糖型阶段，与含复杂型聚糖Fn的功能完全相同，但若停留在杂合型阶段可影响Ln部分功能。这些结果说明高甘露糖型足以具备Ln成熟聚糖的信息，而杂合型却不能。

小　　结

在细胞表面和细胞间质中存在着丰富的糖蛋白和蛋白聚糖。此两者都由蛋白部分和聚糖部分所组成。糖蛋白可分N-连接和O-连接二型，前者聚糖以共价键方式与糖化位点即Asn-X-Ser模序中的天冬酰胺的酰胺N连接，后者与糖蛋白特定Ser残基侧链的羟基共价结合。N-连接聚糖可分成高甘露糖型、复杂型和杂合型三型，它们都是由14个糖基的长萜醇焦磷酸聚糖结构经加工而成。每一步加工都有特异的糖苷酶和糖基转移酶参与。糖蛋白的聚糖参与许多生物学功能，如影响新生肽链的加工，运输和糖蛋白的生物半衰期，参与糖蛋白的分子识别和生物活性等。

蛋白聚糖由糖胺聚糖和核心蛋白组成。体内重要的糖胺聚糖有硫酸软骨素、硫酸性肝素、透明质酸等。蛋白聚糖是主要的细胞外基质成分，它与胶原蛋白以特异的方式相连而赋予基质以特殊的结构。细胞表面的蛋白聚糖还参与细胞黏附、迁移、增殖和分化功能。

细胞间隙填充着许多糖蛋白和蛋白聚糖等，构成ECM。ECM是细胞完成若干生理功能所必须依赖的物质。胶原是结缔组织的主要蛋白质成分。常见的胶原分子可分成5型。胶原一般由3条α肽链，以右手螺旋的方式形成三股螺旋，重复出现的Gly-Pro-X模序是三股螺旋特定空间构象所依赖的一级结构。然后螺旋之间通过醛醇交联的方式形成侧向共价连接的胶原微纤维。微纤维再进一步侧向排列形成胶原纤维。XⅧ型胶原蛋白C端非螺

旋结构域的氨基酸序列含有内皮抑素（endostatin）的全部序列，推测组织中的XⅧ胶原蛋白C端非螺旋结构域受蛋白酶水解，产生内皮抑素，发挥抑制内皮细胞生长作用。

Fn和Ln是普通存在于ECM中的蛋白质。Fn由两条多肽链组成的糖蛋白，主要由成纤维细胞合成，而血浆Fn主要来自肝细胞。Fn的广泛分布决定了它功能的多样性，在血小板聚集、组织损伤的修复、细胞增殖、分化等方面都起着作用。Ln主要介导上皮细胞及内皮细胞黏着于基底膜，从而影响细胞的生长、分化和运动等。

（查锡良）

第二十章　癌基因、抑癌基因与生长因子

一般认为肿瘤的发生是由于单个细胞的转化导致其过度增殖的恶性生长现象。细胞的正常生长与增殖是由两大类信号来调控的，一类信号促进细胞生长和增殖，并阻止其发生终末分化，该类信号过度激活时则表现为肿瘤细胞的恶性生长，现已知多数癌基因（oncogene）起这一作用；另一类信号则抑制增殖，促进分化、成熟和衰老，或发生凋亡（apoptosis），抑癌基因（tumor suppressor gene）则在这方面发挥作用。这两类信号在细胞内产生的效应相互拮抗，维持平衡，对正常细胞的生长、增殖和衰亡进行精确地调控。当这两类基因中任何一种或几种发生变化时即有可能引起细胞增殖失控导致肿瘤的发生。

癌基因与抑癌基因的作用机制涉及信号转导、基因的表达调控以及其控制的细胞分裂和分化过程。癌基因与抑癌基因的表达产物和生长因子多肽及其受体有着极为密切的关系，癌基因可以编码类生长因子多肽及其受体分子，通过细胞内信号转导刺激细胞增殖；癌基因、抑癌基因及生长因子在肿瘤的发生中起重要作用。

第一节　癌　基　因

癌基因最初的定义是指能在体外引起细胞转化，在体内诱发肿瘤的基因。它是细胞本身遗传物质的组成部分，人们将这类存在于生物正常细胞基因组中的癌基因称为原癌基因（proto-oncogenes，pro-onc）或称细胞癌基因（cellular oncogene，c-onc）。在正常情况下，这些基因处于静止或低表达的状态，不仅对细胞无害，而且对维持细胞正常功能具有重要作用；当其受到致癌因素作用被活化（发生过度表达或突变导致激活），则可导致细胞癌变。癌基因的名称一般用三个斜体小写字母表示，如 *myc*、*ras*、*src* 等。

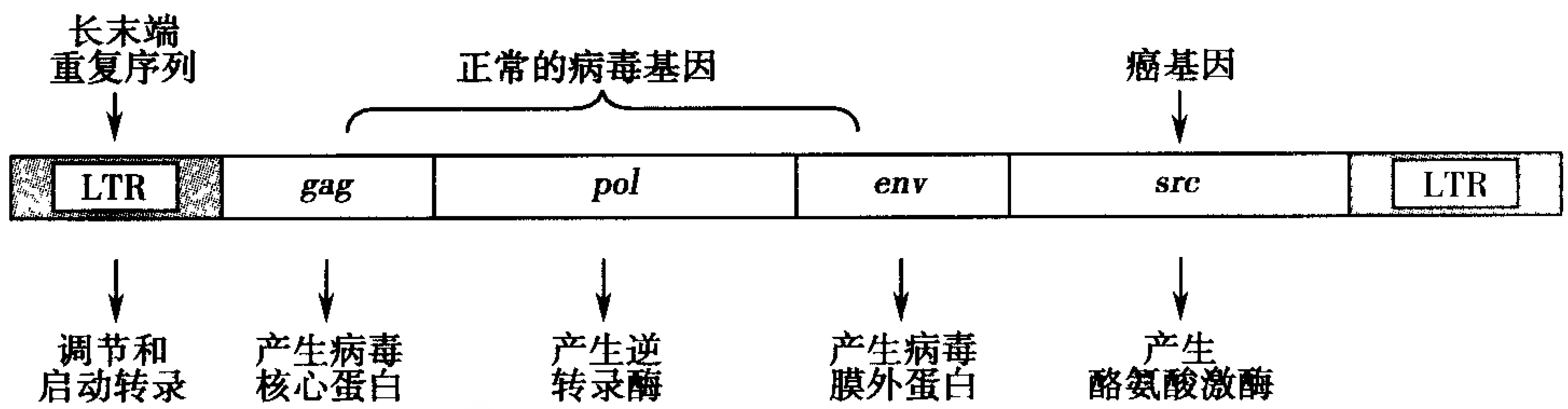
一、病毒癌基因

肿瘤病毒是一类能使敏感宿主产生肿瘤或使培养细胞转化成癌细胞的动物病毒，根据其核酸组成分为 DNA 病毒和 RNA 病毒（即逆转录病毒 retrovirus）。癌基因最初是在逆转录病毒内发现的，1911 年 Peyton Rous 发现含有肉瘤病毒的鸡肉瘤无细胞滤液注入鸡体内可诱发新的肿瘤，当时这一发现并未被人注意，直到数十年后才为人们所重视，P. Rous 因此获得了 1966 年诺贝尔生理医学奖。

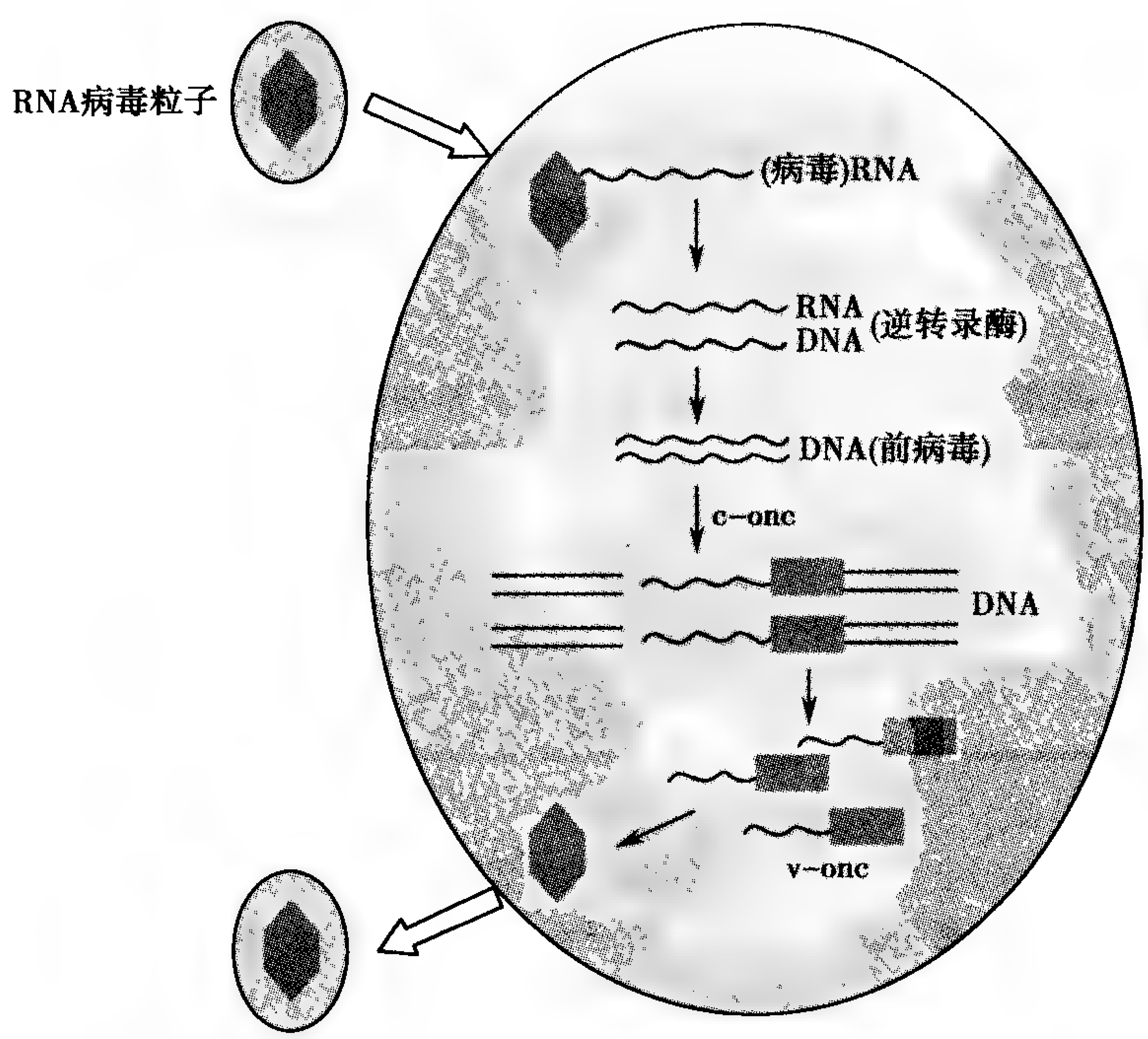
癌基因的发现

1910 年 Peyton Rous 发现 Rous 肉瘤病毒具有致瘤性，并因此于 1966 年获得诺贝尔生理医学奖。研究表明 Rous 肉瘤病毒为逆转录病毒，致瘤的机制是由于其病毒基因组中含有病毒癌基因 *src*。1974 年 J. M. Bishop 和 H. Varmus 发现存在于 Rous 肉瘤病毒中的病毒基因 *src* 存在于正常细胞的基因组（称为细胞癌基因），并发现细胞癌基因在维持细胞的正常功能方面也起着重要作用。

进一步研究证明，在鸡 Rous 肉瘤病毒的核酸中发现有一个特殊癌基因片段 *src*，可使细胞转化（图 20-1）。1974 年 J. Michael Bishop 和 Harold Varmus 发现正常非病毒感染鸡细胞中也存在 *src* 基因片段，随后的研究表明存在于病毒中的癌基因和细胞中的原癌基因是同源的（homolog），即它们的 DNA 顺序是相对应的。逆转录病毒中的癌基因为病毒癌基因，可加前缀 *v*-，如 *v-src*，正常细胞中与其对应的基因细胞癌基因，可冠以前缀 *c*-，如 *c-src*。而癌基因表达的蛋白则用大写字母表示，如 FOS、MYC、RAS 等。逆转录病毒感染宿主以后在宿主细胞内先以病毒 RNA 为模板，在逆转录酶催化下合成双链 DNA 前病毒（provirus），并以前病毒形式在宿主细胞中代代传递下去，随后病毒 DNA 随机整合于细胞基因组，通过重排或重组，将细胞的原癌基因转导（transduction）至病毒本身基因组内（图 20-2），使原来的野生型（wild type）病毒转变成携有癌基因的病毒，从而获得致癌性质。由此可见，病毒癌基因（virus oncogene，v-onc）是一类存在于肿瘤病毒（大多数是逆转录病毒）中的，能使靶细胞发生恶性转化的基因。



● 图 20-1 禽肉瘤病毒（RSV）基因组结构图



● 图 20-2 RNA 病毒与宿主细胞基因组整合过程示意图

二、细胞癌基因

人们因在大部分肿瘤中不能发现肿瘤病毒，20 世纪 70 年代中期提出肿瘤的发生是由于细胞中的原癌基因在诱癌因素的作用下激活或突变为癌基因引起。原癌基因广泛分布于生物界，从单细胞酵母、无脊椎生物到脊椎动物乃至人类的正常细胞都存在着这些基因，这类基因在结构上有很大的同源性，在进化上高度保守。细胞的原癌基因的表达产物对细胞正常生长、繁殖、发育和分化起着精密的调控作用，这类基因的结构发生异常或表达失控，必然导致细胞生长增殖和分化异常，部分细胞发生恶变而形成肿瘤。

根据现有研究结果，原癌基因的特点可概括如下：

1. 广泛存在于生物界中，从酵母到人的细胞普遍存在。

2. 在进化过程中，基因序列呈高度保守性。

3. 它们存在于正常细胞不仅无害，而且对维持正常生理功能、调控细胞生长和分化起重要作用，是细胞生长和分化、组织再生、创伤愈合等所必需。

4. 在某些因素（如放射线、某些化学物质等）作用下，一旦被激活，发生数量上或结构上的变化时，就可能导致正常细胞癌变。

按其表达蛋白的功能及定位可将常见的癌基因进行以下分类（表 20-1）

表 20-1　细胞癌基因的分类及功能

类　别	癌　基　因	同源的细胞基因
蛋白激酶类		
1. 跨膜生长因子受体	*erb B*	EGF 受体
	neu（*erb-2*、*HER-2*）	EGF 受体相似物
	fms、*ros*、*kit*、*ret*、*sea*	M-CSF 受体
2. 膜结合的酪氨酸蛋白激酶	*src* 族（*src*、*fgr*、*yes*、*lck*、*nck*、*fym*、*fes*、*fps*、*lyn*、*tkl*）、*abl*	
3. 可溶性酪氨酸蛋白激酶	*met*、*trk*	
4. 胞质丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	*raf*（*mil*、*mht*）、*mos*	
	cot、*pl-1*	
5. 非蛋白激酶受体	*mas*	血管紧张素受体
	erb	甲状腺激素受体
信息传递蛋白类		
1. 与膜结合的 GTP 结合蛋白	*H-ras*、*K ras*、*N-ras*	
2. 生长因子类	*sis*	PDGF-2
	int-2	FGF 同类物
3. 核内转录因子	*c-myc*、*N-myc*、*L-myc*	转录因子
	fos、*jun*	转录因子 AP-1

EGF：表皮生长因子　M-CSF：巨噬细胞集落刺激因子
PDGF-2：血小板源生长因子 2　FGF：成纤维细胞生长因子

功能上相关的癌基因可分为以下家族：

1. *src* 家族：包括 *src*、*abl*、*fgr*、*fes*、*yes*、*fps*、*lck*、*kek*、*fym*、*lyn*、*tkl*，它们的产物多具有酪氨酸蛋白激酶活性，定位于跨膜部分，有的也可游离于细胞质中。Src 蛋白可被受体酪氨酸蛋白激酶（如 PDGF 受体）活化，而其他成员可则被非酪氨酸蛋白激酶受

体（如 CD4 和 CD8 受体）活化，促进增殖信号的转导，

2. *ras* 家族：包括 *H-ras*、*K-ras*、*N-ras*，虽然它们之间的核苷酸序列相差很大，但所编码的蛋白质都为 21kD 的小 G 蛋白 P21，位于细胞质膜内面，P21 可与 GTP 结合，有 GTP 酶活性，并参与 cAMP 水平的调节。

3. *myc* 家族：包括 *c-myc*、*N-myc*、*L-myc*、*fos* 等数种基因，这些基因编码核内 DNA 结合蛋白，有直接调节其他基因转录的作用。

4. *sis* 家族：只有 *sis* 基因一个成员，其编码的 p28 与人血小板源生长因子（PDGF）同源，能刺激间叶组织的细胞分裂繁殖。

5. *myb* 家族：包括 *myb* 和 *myb-ets* 两个成员，为核内的一种转录因子。

综上所述，癌基因及其表达产物为细胞正常生理功能的一部分，癌基因所表达的蛋白质未必都具致癌活性，因此原来“癌基因”的定义显然是不全面的，有必要对“癌基因”这一定义加以修正。目前认为广义的“癌基因”应当是：凡能编码生长因子、生长因子受体、细胞内生长信息传递分子以及与生长有关的转录调节因子的基因均应归属癌基因的范畴。

三、癌基因活化的机制

正常情况下，存在于动物基因组中的原癌基因处于低表达或不表达，对机体并不构成威胁。相反，它们还具有重要的生理功能。然而在某些条件下，如病毒感染、化学致癌物或辐射作用等，它们可被异常激活，变为癌基因，诱导细胞发生癌变。癌基因被激活的方式分为以下四类：

（一）获得启动子和（或）增强子

当逆转录病毒感染细胞后，病毒基因组所携带的长末端重复序列（LTR 内含较强的启动子和增强子）插入到细胞原癌基因附近或内部，可以启动下游邻近基因的转录和影响附近结构基因的转录水平，使原癌基因过度表达或由不表达变为表达，从而导致细胞发生癌变。如鸡白细胞增生病毒引起的淋巴瘤，就因为该病毒 DNA 序列整合到宿主正常细胞的 *c-myc* 基因的附近，其 LTR 亦同时被整合，成为 *c-myc* 的启动子。这个强启动子可促使 *c-myc* 的表达比正常高 30～100 倍。

（二）染色体易位

染色体易位在肿瘤组织中屡见不鲜。基因定位研究证明，在染色体易位的过程中发生了某些基因的易位和重排，使原来无活性的原癌基因移至强的启动子或增强子附近而被活化，原癌基因表达增强，导致肿瘤的发生。最受到普遍认可的例子是在人 Burkit 淋巴瘤细胞中，位于 8 号染色体上的 *c-myc* 移到 14 号染色体免疫球蛋白重链基因的调节区附近，与该区活性很高的启动子连接而受到活化。

（三）原癌基因扩增

在正常情况下，细胞经过一个细胞周期，DNA 只复制一次，有时却可复制数次或更多，导致原癌基因拷贝数量的增加。其表达的蛋白质量明显上升也会导致肿瘤的发生。在 30%的乳腺癌人群中 erbB2/HER2 基因拷贝数升高，其目的蛋白的表达量上升。

（四）点突变

原癌基因在射线或化学致癌剂作用下，可能发生单个碱基的替换——点突变（point mutation），从而改变了表达蛋白的氨基酸组成，造成蛋白质结构的变异。如 *ras* 家族的癌基因，在正常细胞 *H-ras* 中的 GGC，在膀胱癌肿瘤细胞中突变为 GTC，由此变成编码的

P21蛋白第12位氨基酸由正常细胞的甘氨酸变为肿瘤细胞的缬氨酸。

不同的癌基因在不同的情况下可通过不同的途径被激活，其结果可以是：①出现新的表达产物，即原来不表达的基因开始表达或不该在这个时期表达的基因进行表达；②出现过量的正常表达产物；③出现异常、截短的表达产物。以上异常情况，在肿瘤细胞中可以出现一种或两种以上的组合。

许多研究表明，肿瘤发生是一个多步骤的发展过程，需要多种癌基因协同作用，对结肠癌遗传模型的研究提示，在该肿瘤的发展过程中涉及6～7个基因突变，它们分别在结肠癌的不同过程起作用。癌基因的协同作用主要表现在癌基因表达蛋白之间的相互作用上，其中以核内癌基因产物与胞质癌基因产物的协同作用最为典型，核内转录调控蛋白MYC极易与胞质膜结合蛋白RAS发生协同作用导致细胞转化。

四、原癌基因的产物与功能

目前已知的癌基因编码的蛋白质与细胞生长调控的许多因子有关，这些因子参与细胞生长、增殖、分化途径各个环节的调控。为了便于叙述，将癌基因表达产物按其在细胞信号传递系统中的作用分成以下四类：

（一）细胞外的生长因子

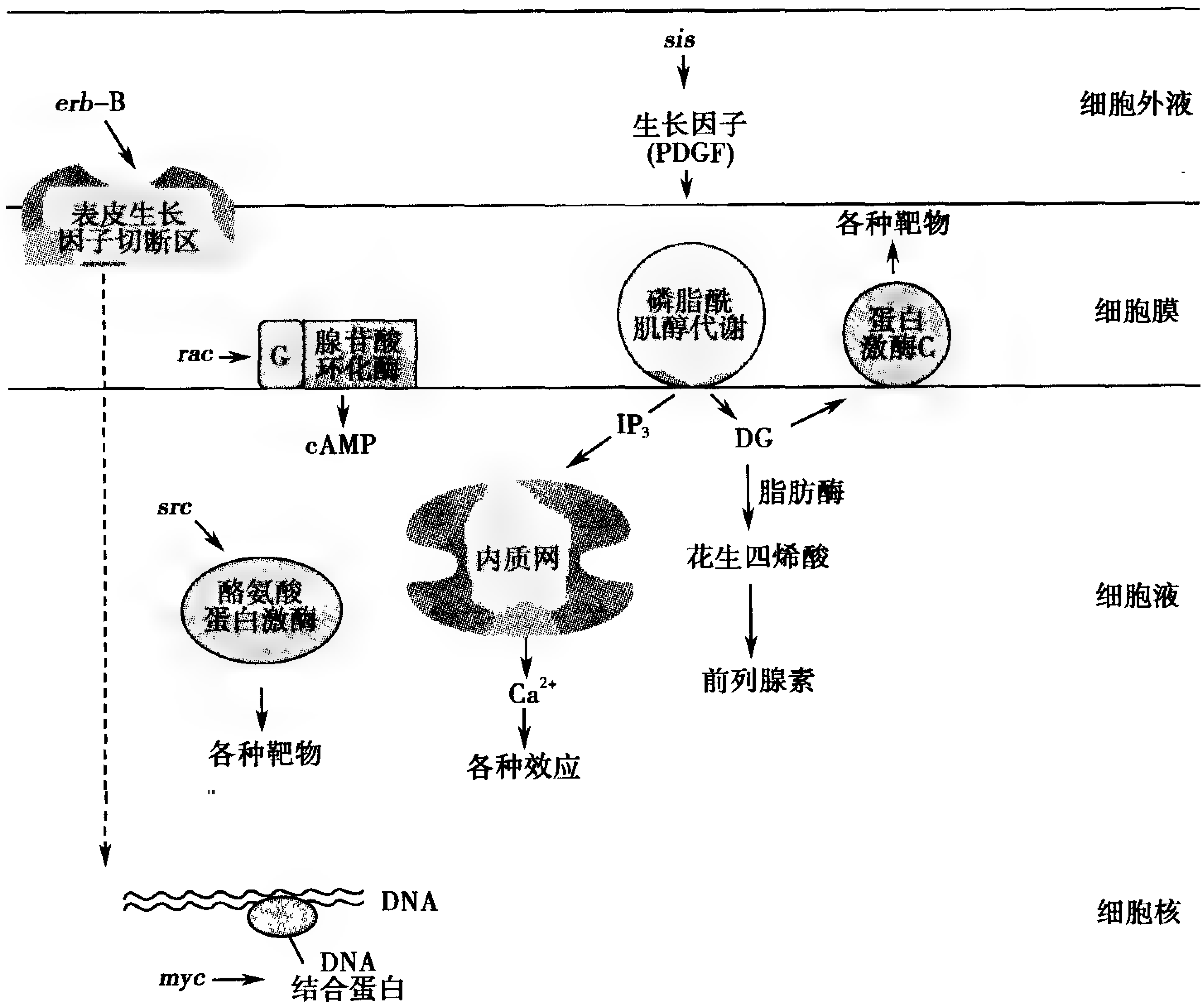
细胞外信号包括：生长因子、激素、神经递质和药物等，它们作用于细胞膜上的受体系统或直接被传递至细胞内，再通过多种蛋白激酶活化，对转录因子进行磷酸化修饰，引发一系列基因的转录激活。*sis*基因正是通过这种途径起作用的。已知*v-sis*基因和人*c-sis*基因编码的P28蛋白和血小板源生长因子（PDGF）的β链同源，当*sis*基因表达产物与PDGF一样形成二聚体后，作用于PDGF受体，使细胞膜内的磷脂酰肌醇在相应激酶催化下，生成磷脂酰肌醇4，5-双磷酸（PIP_2），后者在磷脂酶C作用下水解生成甘油二酯（DG）及三磷酸肌醇（IP_3）并激活蛋白激酶C，使受体细胞发生转化，同时还能刺激细胞内受体合成（图20-3）。说明*sis*基因和PDGF相关，功能也十分相似。此外，*c-sis*表达蛋白P28和PDGF一样能促进血管的生长。目前已知与恶性肿瘤发生有关的生长因子有：PDGF、表皮生长因子（EGF）、转化生长因子-2（TGF-2）、成纤维细胞生长因子（FGF）、类胰岛素生长因子Ⅰ（IGF-Ⅰ）等。这些因子的过度表达，势必连续不断作用于相应的受体细胞，造成大量生长信号的持续输入，从而使细胞增殖失控。

（二）跨膜的生长因子受体

另一类原癌基因的产物为跨膜受体，它能接受细胞外的生长信号并将其传入胞内（图20-3）。跨膜生长因子受体有胞质结构区域，并具有酪氨酸特异的蛋白激酶活性。许多原癌基因的产物同样具有该酶活性，例如*c-src*、*c-abl*等。另一些癌基因（*c-mos*和*raf*）所编码的激酶不是在酪氨酸上磷酸化，而是使丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化。通过这种磷酸化作用，使其结构发生改变，增加激酶对底物的活性，加速生长信号在胞内的传递。

（三）细胞内信号传导体

生长信号到达胞内后，借助一系列胞内信息传递体系，将接受到的生长信号由胞内传至核内，促进细胞生长。这些传递体系成员多数是原癌基因的产物，或者通过这些基因产物的作用影响第二信使[如：环一磷酸腺苷（cAMP）、甘油二酯（DG）、Ca^{2+}、环一磷酸鸟苷（cGMP）等]。作为胞内信息传递体的癌基因产物包括：非受体酪氨酸激酶（*c-src*，*c-abl*等）、丝氨酸/苏氨酸激酶（*c-ras*，*c-mas*），*ras*蛋白（*H-ras*，*K-ras*和*N-ras*等）及磷脂酶（*crk*产物）。



●图 20-3　癌基因与生长信息传递
IP_3：三磷酸肌酯　DG：甘油二酯

（四）核内转录因子

已知某些癌基因（如 *myc*、*fos* 等）表达蛋白定位于细胞核内，它们能与靶基因的顺式调控元件相结合直接调节靶基因的转录活性起转录因子作用（图 20-3）。这些蛋白质通常在细胞受到生长因子刺激时迅速表达，促进细胞的生长与分裂过程。目前普遍认为，*c-fos* 是一种即刻早期反应基因（immediate early gene，IEG）。在生长因子、佛波酯、神经递质等作用下，*c-fos* 能即刻、短暂表达，作为传递信息的第三信使。

原癌基因具有广泛的生物学功能，所谓原癌基因，不仅与癌瘤有关，实际上它们是以调节细胞生长、分化为主要功能的正常基因组成分。除癌瘤外，其他与生长、分化异常相关的疾病，直接或间接均与原癌基因的异常表达有关。

第二节　抑 癌 基 因

抑癌基因是一类能抑制细胞过度生长、增殖从而遏制肿瘤形成的基因。对于正常细胞，调控生长的基因（如原癌基因等）和调控抑制生长的基因（如抑癌基因等）的协调表达是控制细胞正常生长的重要分子机制之一。这两类基因相互制约，维持正负调节信号的相对稳定。当细胞生长到一定程度时，会自动产生反馈性抑制，这时抑制性基因高表达，调控生长的基因则不表达或低表达。前已述及，癌基因激活与过量表达与肿瘤的形成有关。同时，抑癌基因的丢失或失活也可能导致肿瘤发生。

一、抑癌基因的基本概念

抑癌基因的发现是从细胞杂交实验开始的。当一个肿瘤细胞和一个正常细胞融合为一个杂交细胞，往往不具有肿瘤的表型，甚至由两种不同肿瘤细胞形成的杂交细胞也可呈非肿瘤型。只有当这些正常亲代细胞完全失去了某些基因后，才会形成肿瘤的子代细胞。由此人们推测，在正常细胞中可能存在一种肿瘤抑制基因，阻止杂交细胞发生肿瘤，当这种基因缺失或变异时，抑瘤功能丧失，导致肿瘤生成。而在两种不同肿瘤细胞杂交融合后，由于它们缺失的抑癌基因不同，在形成的杂交体中，各自缺失的抑癌基因发生交叉互补，所以也不会形成肿瘤。

二、常见的抑癌基因

目前公认的抑癌基因有 10 余种（表 20-2）。必须指出，最初在某种肿瘤中发现的抑癌基因，并不意味其与别的肿瘤无关；恰恰相反，在多种组织来源的肿瘤细胞中往往可检测出同一抑癌基因的突变、缺失、重排、表达异常等，这正说明抑癌基因的变异构成某些共同的致癌途径。

表 20-2　常见的某些抑癌基因

名　称	染色体定位	相关肿瘤	作　用
P53	17p	多种肿瘤	编码 P53 蛋白（转录因子）
Rb	13q14	视网膜母细胞瘤、骨肉瘤、肺癌、乳癌	编码 P105 Rb 蛋白（转录因子）
P16	9p21	黑色素瘤	编码 P16 蛋白
APC	5q21	结肠癌	可能编码 G 蛋白
DCC	18q21	结肠癌	编码表面糖蛋白（细胞黏着分子）
NF1	7q12.2	神经纤维瘤	编码 GTP 酶激活剂
NF2	22q	神经鞘膜瘤、脑膜瘤	编码连接膜与细胞骨架的蛋白
VHL	3p	小细胞肺癌、宫颈癌	编码转录调节蛋白
WT1	11p13	肾母细胞瘤	编码锌指蛋白（转录因子）

三、抑癌基因的作用机制

由于抑癌基因的分离鉴定研究晚于原癌基因，目前仅对 p53 和 Rb 两种抑癌基因的作用机制了解比较充分。

（一）视网膜母细胞瘤基因（Rb 基因）

Rb 基因是最早发现的肿瘤抑制基因，最初发现于儿童的视网膜母细胞瘤（retinoblastoma），因此称为 Rb 基因。在正常情况下，视网膜细胞含活性 Rb 基因，控制着成视网膜细胞的生长发育以及视觉细胞的分化。Rb 基因一旦丧失功能或先天性缺失，成视网膜细胞则出现异常增殖，形成成视网膜细胞瘤。Rb 基因失活还见于骨肉瘤、小细胞肺癌、乳腺癌等许多肿瘤，说明 Rb 基因的抑癌作用具有一定的广泛性。

Rb 基因比较大，位于人 13 号染色体 q14，含有 27 个外显子，转录 4.7kb 的 mRNA，编码蛋白质为 P105，定位于核内，有磷酸化和非磷酸化（或低磷酸化）两种形式。非磷

酸化（或低磷酸化）形式为活性型，能促进细胞分化，抑制细胞增殖。实验表明，将 Rb 基因导入成视网膜细胞瘤或成骨肉瘤细胞，结果发现这些恶性细胞的生长受到抑制。

Rb 蛋白的磷酸化程度与细胞周期密切相关，Rb 蛋白是通过结合或释放转录因子 E_2F 来控制检查点进而控制细胞周期，E_2F 是一类激活转录作用的活性蛋白，控制着 S 期的重要蛋白的合成（如 DNA 合成酶）。在 G_0、G_1 期，低磷酸化的 Rb 蛋白和 E_2F 结合，使 E_2F 处于非活化状态。在 S 期，高磷酸化的 Rb 释放 E_2F，结合状态的 E_2F 变成游离状态，促使细胞进入细胞周期。肿瘤癌基因的产物能模仿高磷酸化 Rb 阻止其和 E_2F 结合。在很多肿瘤细胞中，细胞周期不被 Rb 调控，使细胞周期混乱。当 Rb 基因发生缺失或突变，丧失结合、抑制 E_2F 的能力，于是细胞增殖活跃，导致肿瘤发生。

（二）p53

人类 p53 基因定位于 17 号染色体 p13，全长 16～20kb，含有 11 个外显子，转录 2.8kb 的 mRNA，编码蛋白质为 P53，是一种核内磷酸化蛋白。p53 基因是迄今为止发现的与人类肿瘤相关性最高的基因。过去一直把它当成一种癌基因，直至 1989 年才知道起癌基因作用的是突变 p53，后来证实野生型 p53 是一种抑癌基因。

p53 基因表达产物 P53 蛋白由 393 个氨基酸残基构成，在体内以四聚体形式存在，半衰期为 20～30 分钟。按照氨基酸序列将 P53 蛋白分为三个区：

（1）核心区：位于 P53 蛋白分子中心，由第 102～290 位氨基酸残基组成，在进化上高度保守，在功能上十分重要，包含有结合 DNA 的特异性氨基酸序列。

（2）酸性区：位于 N 端，由 N 端第 1～80 位氨基酸残基组成，易被蛋白酶水解，半衰期短与此有关。含有一些特殊的磷酸化位点。

（3）碱性区：位于 C 端，由 C 端第 319～393 位氨基酸残基组成。P53 蛋白通过这一片段可形成四聚体。C 端可以单独具备转化活性起癌基因作用，且有多个磷酸化位点，为多种蛋白激酶识别。

正常情况下，细胞中 P53 蛋白含量很低，因其半衰期短，所以很难检测出来，但在生长增殖的细胞中，可升高 5～100 倍以上。野生型 P53 蛋白在维持细胞正常生长、抑制恶性增殖中起着重要作用，因而被冠以“基因卫士”称号。p53 基因时刻监控着细胞染色体 DNA 的完整性，一旦细胞染色体 DNA 遭到损害，P53 蛋白与基因的 DNA 相应部位结合，起特殊转录因子作用，活化 p21 基因转录，使细胞停滞于 G_1 期；抑制解链酶活性；并与复制因子 A（replication factor A）相互作用，参与 DNA 的复制与修复。如果修复失败，P53 蛋白即启动程序性死亡（凋亡）过程诱导细胞自杀，阻止有癌变倾向突变细胞的生成，从而防止细胞恶变。

当 p53 基因发生突变后，由于空间构象改变影响到转录活化功能及 P53 蛋白的磷酸化过程，这不仅失去野生型 p53 抑制肿瘤增殖的作用，而且突变本身又使该基因具备癌基因功能。突变的 P53 蛋白与野生型 P53 蛋白相结合，形成的这种寡聚蛋白不能结合 DNA，使得一些癌变基因转录失控导致肿瘤发生。

值得提出的是，所谓“抑癌基因”也是在肿瘤研究过程中命名的。事实上，细胞抑癌基因也是细胞染色体 DNA 的正常组成成分，具有重要的生理功能。除了肿瘤以外，它们在多种疾病过程中发挥重要作用。

第三节 生 长 因 子

一、概述

培养细胞的生长、增殖需要一系列营养物质：各种氨基酸、维生素和无机盐等。如果

不添加胎牛血清，细胞则不能继续生长。只有在加入新鲜血清条件下，细胞才能生长、增殖。原来血清中含有一系列生长因子，它们通过质膜上特异的受体，将信息传递至细胞内部，这类调节细胞生长与增殖的多肽类物质称为生长因子（growth factor）。

根据生长因子产生细胞与接受生长因子作用的细胞相互之间的关系，可概括为以下三种模式：①内分泌（endocrine）：生长因子从细胞分泌出来后，通过血液运输作用于远端靶细胞。如血小板源生长因子（PDGF）源于血小板，作用于结缔组织细胞。②旁分泌（paracrine）：细胞分泌的生长因子作用于邻近的其他类型细胞，对合成、分泌该生长因子的自身细胞不发生作用，因为它缺乏相应受体。③自分泌（autocrine）：生长因子作用于合成及分泌该生长因子的细胞本身。生长因子以后两种的作用方式为主。常见的生长因子见表 20-3。

表 20-3　常见的生长因子

生长因子	来　源	功　能
表皮生长因子（EGF）	颌下腺	促进表皮与上皮细胞的生长
促红细胞生成素（EPO）	肾、尿	调节成红细胞的发育
类胰岛素生长因子（IGF）	血清	促进硫酸盐参入到软骨组织
		促进软骨细胞的分裂、对多种组织细胞起胰岛素样作用
神经生长因子（NGF）	颌下腺	营养交感和某些感觉神经元
血小板源生长因子（PDGF）	血小板	促进间质及胶质细胞的生长
转化生长因子 α（TGF-α）	肿瘤细胞	类似于 EGF
	转化细胞	
转化生长因子 β（TGF-β）	肾、血小板	对某些细胞起促进和抑制双向作用

二、生长因子的作用机制

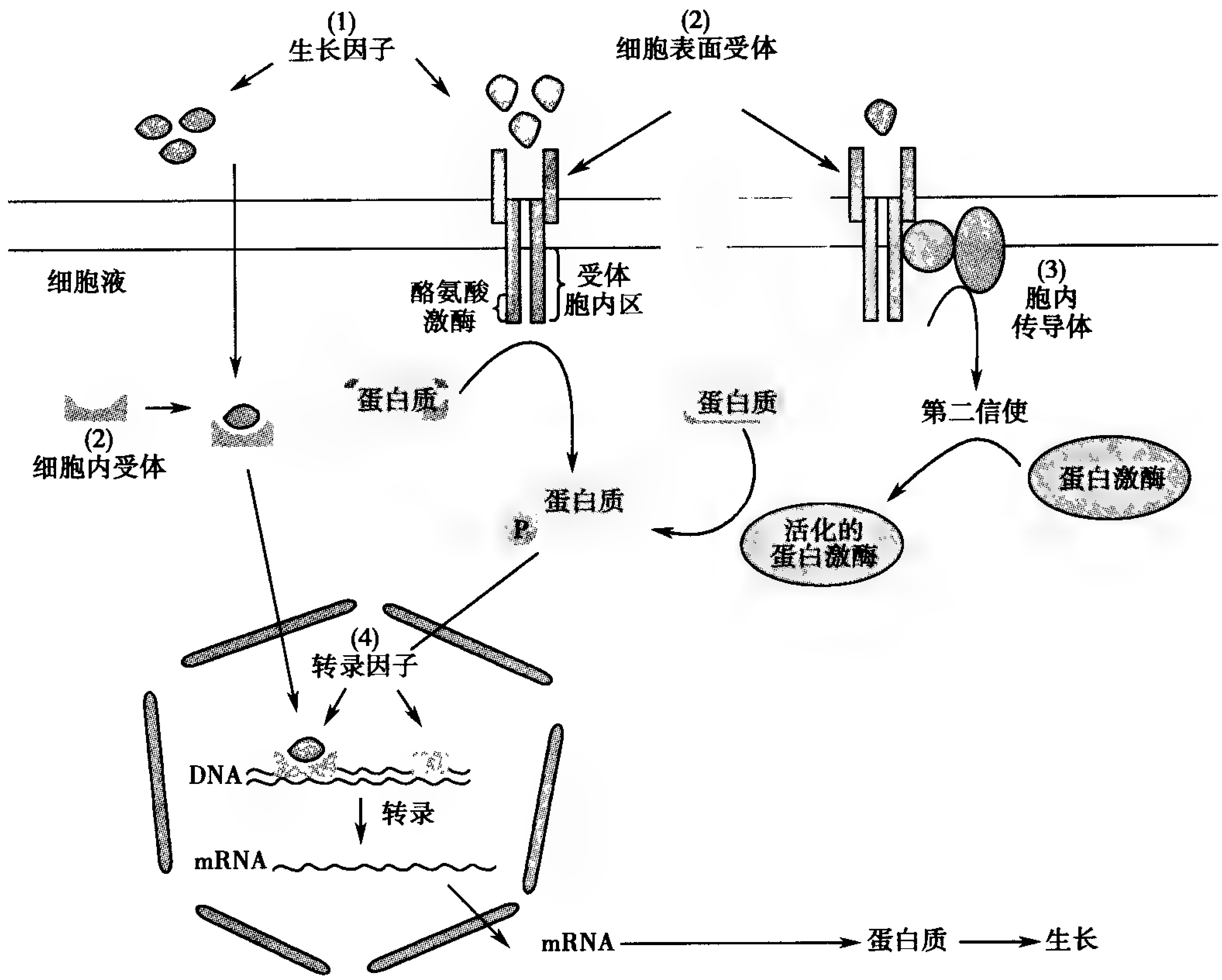
生长因子由不同的细胞合成后分泌，作用于靶细胞上的相应受体。这些受体有的是位于细胞膜上；有的是位于细胞内部。位于膜表面的受体是跨膜的受体蛋白，包含具有酪氨酸激酶活性的胞内结构域。当生长因子与这类受体结合后，受体所包含的酪氨酸激酶被活化，使胞内的相关蛋白质直接被磷酸化。另一些膜上的受体则通过胞内信号传递体系，产生相应的第二信使，后者使蛋白激酶活化，活化的蛋白激酶同样可使胞内相关蛋白质磷酸化。这些被磷酸化的蛋白质再活化核内的转录因子，引发基因转录，达到调节生长与分化的作用（图 20-4）。

另一类生长因子受体是定位于胞液。当生长因子与胞内相应的受体结合后，形成生长因子-受体复合物，后者亦可进入胞核活化相关基因促进细胞生长（图 20-4）。

许多癌基因表达产物有的属于生长因子或生长因子受体；有的属于胞内信息传递体抑或核内转录因子（表 20-4）。发生突变的原癌基因可能生成上述产物的变异体，后者的生成及过量表达导致细胞生长、增殖失控，引起病变。

三、生长因子与疾病

癌基因、抑癌基因及生长因子与肿瘤的发生有密切的关系，许多癌基因通过生长因子



●图 20-4 生长因子作用机制示意图

及其受体发挥作用。然而随着研究的深化，癌基因、抑癌基因及生长因子不仅涉及肿瘤的发生，而且与许多重大疾病及生物学中一些热点问题（如细胞凋亡等）也有十分密切的关系。

表 20-4 某些癌基因表达产物的细胞定位与功能

癌基因	表达产物	
	定 位	功 能
sis	由细胞分泌	生长因子
erbB	质膜	生长因子受体
fms	质膜	生长因子受体
trk	质膜	生长因子受体
src	胞液	酪氨酸蛋白激酶
abl	胞液	酪氨酸蛋白激酶
raf	胞液	丝氨酸蛋白激酶
ras	胞液	GTP 结合蛋白
jun	核	转录因子
fos	核	转录因子
myc	核	DNA 结合蛋白

（一）细胞凋亡（apoptosis）

细胞凋亡是在某些生理或病理条件下，细胞接受到某种信号所触发的并按一定程序进行的主动、缓慢的死亡过程。借此机体让不需要的细胞消亡，在生长发育和维持组织器官细胞数目恒定以维持内环境的平衡方面起很大作用。因此，它是细胞的一种不同于坏死的死亡方式，是细胞内的有规律的自我消亡过程。这一过程对控制细胞增殖，防止肿瘤的发生与生长有重要意义。

诱导细胞发生凋亡的因素很多，如野生型 p53 基因能诱发髓性白血病及其他癌细胞凋亡等。另一方面，某些癌基因具有抑制细胞凋亡的作用，如突变型 p53、神经生长因子（NGF）等。

细胞凋亡与肿瘤发生与生长有着密切的关系。肿瘤不仅是细胞增殖、分化异常的疾病，同时，也可能是一种凋亡异常的疾病。有关这一问题，有待进一步研究阐明。

（二）心血管疾病

1. 原发性高血压：原癌基因的功能是调节细胞生长、分化及增殖。高血压的细胞学改变是血管平滑肌细胞及成纤维细胞增生，使血管变窄、变厚，导致外周阻力增加。这种以平滑肌增生为主的疾病与癌基因关系极大。实验表明，*myc* 和 *fos* 原癌基因的激活是平滑肌细胞增生的启动因素之一，*myc* 原癌基因对平滑肌增生的调控可能是在转录后水平，而 *fos* 可能是发生在转录水平。原发性高血压大鼠心肌和平滑肌细胞内 *myc* 原癌基因表达比对照动物高出 50%～100%，提示 *myc* 原癌基因的激活与高血压发生有关。此外，作为负调控的抑癌基因的变化亦参与高血压病的发生。例如，在原发性高血压大鼠血管平滑肌细胞中野生型 p53 抑癌基因的表达低于正常动物，基因有甲基化倾向，并测出 p53 基因的突变。

2. 动脉粥样硬化：动脉粥样硬化也是一种以细胞增殖和变性为主要特征的疾病。近年的研究表明，癌基因和抑癌基因与动脉粥样硬化可能有密切关系。动脉粥样硬化斑块损伤的细胞，癌基因表达比正常组织高约 5～12 倍。癌基因的高表达产生过量的血小板源生长因子（PDGF），后者作用于 PDGF 受体，导致组织细胞的增生，引起血管壁斑块形成。

3. 心肌肥厚：原癌基因存在于正常心肌、血管平滑肌和内皮细胞中，为心血管生长发育所必需。然而心肌肥厚时，许多癌基因（*ras*、*myb*、*myc*、*fos* 等）发生过量表达。生长因子在心肌肥厚发生中的作用十分关键，在心肌负荷与心肌反应之间起着中介与信息传递的作用，由此引发癌基因过量表达，造成心肌肥厚。与此有关的生长因子有：类胰岛素生长因子（IGF）、转化生长因子（TGF）及成纤维细胞生长因子（FGF）等。

综上可见，癌基因及抑癌基因的异常表达及结构改变与许多心血管病的发生有密切的关系。

小　　结

癌基因可分为病毒癌基因和细胞癌基因，前者包括 DNA 肿瘤病毒的癌基因和 RNA 病毒的癌基因，细胞癌基因又称为原癌基因。病毒癌基因源于细胞癌基因。病毒癌基因能使宿主细胞发生恶性转化，形成肿瘤。正常的原癌基因为生命活动所必需，调节细胞的正常生长与分化。当原癌基因被激活，基因结构发生异常或表达失控，可导致细胞恶变形成肿瘤。原癌基因被激活的方式有：①获得启动子与增强子；②基因易位；③基因扩增；④点突变等。肿瘤的发生与发展往往涉及多种癌基因在不同的癌变阶段相继激活，发生协同作用。

生长因子是细胞合成与分泌的一类多肽物质，它作用于靶细胞受体，将信息传递至细

胞内部，促进细胞生长、增殖。

细胞原癌基因的表达产物有的是生长因子或生长因子受体；有的是胞内信息传递体（G蛋白、蛋白激酶）或核内转录因子。被激活的原癌基因可能使上述表达产物发生结构改变、过量表达导致细胞生长、增殖失控。

抑癌基因是一类控制细胞生长的负调节基因，它与负责调节生长的原癌基因协调表达以维持细胞正常生长、增殖与分化。抑癌基因缺失或突变失活不仅丧失抑癌作用，反而变成具备促癌效应的癌基因。原癌基因、抑癌基因是细胞正常基因组成成分，在生理条件下，它们的表达产物具有调节细胞生长、分化等多种功能。癌基因、抑癌基因和生长因子在多种疾病的发生发展过程中起作用。

（汤其群 温博贵）

第二十一章　常用分子生物学技术的原理及其应用

分子生物学理论研究的突破无一不与分子生物学技术的产生和发展息息相关，可以说两者是科学与技术相互促进的最好例证，即理论上的发现为新技术的产生提供思路，而新技术的产生又为证实原有理论和发展新理论提供有力的工具。因此，了解分子生物学技术原理及其用途，对于加深理解现代分子生物学的基本理论和研究现状、深入认识疾病的发生和发展的机制、理解和应用基于分子生物学的新的诊断和治疗方法极有帮助。为此本章概括介绍目前分子生物学中的一些常用技术及其在医学上的应用。

第一节　分子杂交与印迹技术

一、分子杂交和印迹技术的原理

分子杂交是利用DNA变性与复性这一基本性质来进行DNA或RNA定性或定量分析的一项技术。分子杂交技术的原理主要涉及分子杂交特性、印迹技术和探针技术几个方面，其中分子杂交的概念在第二章已有详细描述，这里仅介绍印迹和探针技术。

（一）印迹技术

1975年，E. Southern将琼脂糖电泳分离的DNA片段在胶中变性使其成为单链，然后将硝酸纤维素（nitrocellulose，NC）膜放在胶上，上置一定厚度的吸水纸巾，利用毛细作用使胶中的DNA转移到NC膜上，使之成为固相化分子。将载有DNA单链分子的NC膜放在溶液（杂交液）中，溶液中具有互补序列的DNA或RNA单链分子就可以结合到存在于NC膜上的DNA分子上。这一技术类似于用吸墨纸吸收纸张上的墨迹，因此称之为“blotting”，译为印迹技术。目前这种技术已广泛用于DNA、RNA和蛋白质的检测。除了上述靠毛细作用将DNA转移至NC膜外，后来又发展了电转移印迹技术和真空吸引转移印迹，缩短了转移所需的时间。另外亦有一些新的材料用于转移膜而改善转移效率和样品承载能力。

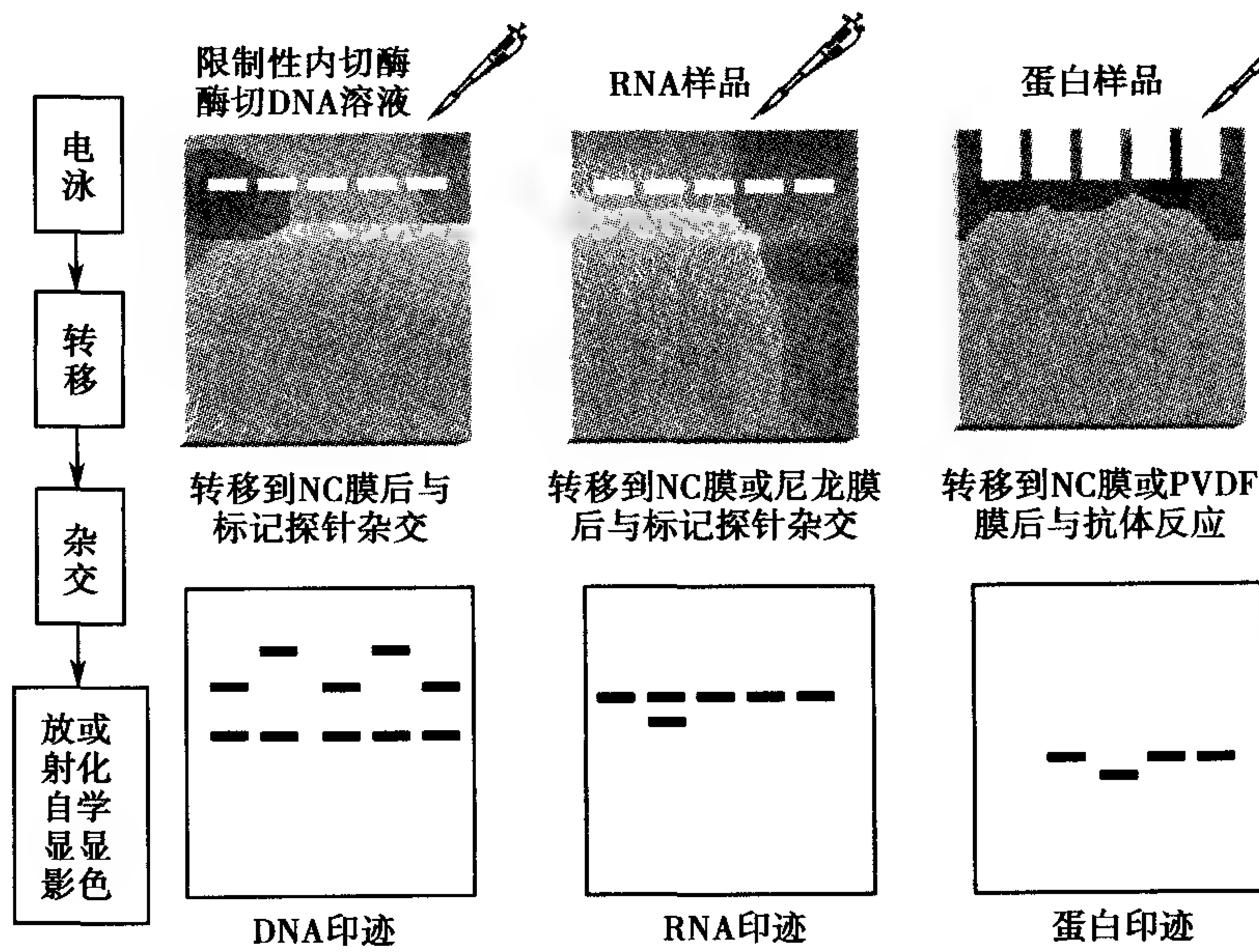
（二）探针技术

探针（probe）是带有特殊可检测标记的核酸片段，它具有特定的序列，能够与待测的核酸片段互补结合，因此可以用于检测核酸样品中存在的特定基因。核酸探针既可以是人工合成的寡核苷酸片段，也可以是基因组DNA片段、cDNA全长或部分片段，还可以是RNA片段。常用放射性核素、生物素或荧光染料来标记探针。在NC膜杂交反应中，标记探针的序列如果与NC膜上的核酸序列互补，就可以结合到膜上的相应DNA或RNA区带，经放射自显影或其他检测手段就可以判定膜上是否有互补的核酸分子存在。

二、印迹技术的类别及应用

印迹技术可以分为DNA印迹技术、RNA印迹技术和蛋白质印迹技术三大类。它们的基本流程如图21-1所示。

（一）DNA印迹



●图 21-1 DNA 印迹、RNA 印迹和蛋白印迹技术示意图

DNA 印迹（DNA blot）为 Southern 首次应用，因而以其姓氏命名为 Southern blot。DNA 样品经限制性内切酶消化后行琼脂糖凝胶电泳，将含有 DNA 区带的凝胶在变性溶液中处理后，使胶中的 DNA 分子转移到 NC 膜上。转移完成后，在 80℃真空条件下加热或在紫外交联仪内处理使 DNA 固定于 NC 膜上，便可用于杂交反应。DNA 印迹技术主要用于基因组 DNA 的定性和定量分析，例如对基因组中特异基因的定位及检测等，此外亦可用于分析重组质粒和噬菌体。

（二）RNA 印迹

利用与 DNA 印迹相类似的技术来分析 RNA 就称为 RNA blot。相对于 Southern blot，有人将 RNA 印迹称为 Northern blot，其技术原理与 Southern blot 相同。RNA 分子较小，在转移前无需进行限制性内切酶切割，而且变性 RNA 的转移效率也比较高。RNA 印迹技术目前主要用于检测某一组织或细胞中已知的特异 mRNA 的表达水平，也可以比较不同组织和细胞中的同一基因的表达情况。尽管用 RNA 印迹技术检测 mRNA 表达水平的敏感性较 PCR 法（见下节）低，但是由于其特异性强，假阳性率低，仍然被认为是最可靠的 mRNA 水平分析方法之一。

（三）蛋白质的印迹分析

印迹技术不仅可用于核酸的分子杂交，而且也可用于蛋白质的分析。人们发现蛋白质在电泳之后也可以被从胶中转移和固定到膜型材料上，再与溶液中相应的蛋白分子相互结合，其中最常用的是用抗体来检测，因此被称为免疫印迹（immunoblot）。相对应于 DNA 的 Southern blot 和 RNA 的 Northern blot，蛋白质印迹被称为 Western blot。

蛋白质印迹需首先将混合蛋白质用聚丙烯酰胺凝胶电泳按分子大小分开，再将蛋白质转移到 NC 膜或其他膜上。蛋白质的转移只有靠电转移方可实现。蛋白质的分析主要靠抗体来进行。特异性抗体（称为第一抗体）首先与转移膜上相应的蛋白分子结合，然后用碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶标记或放射性核素标记的第二抗体与之结合。反应之后用放射自显影或底物显色来检测蛋白质区带的信号，底物亦可与化学发光剂结合以提高敏感度。蛋白质印迹技术用于检测样品中特异性蛋白质的存在、细胞中特异蛋白质的半定量分析以及蛋白质分子的相互作用研究等。

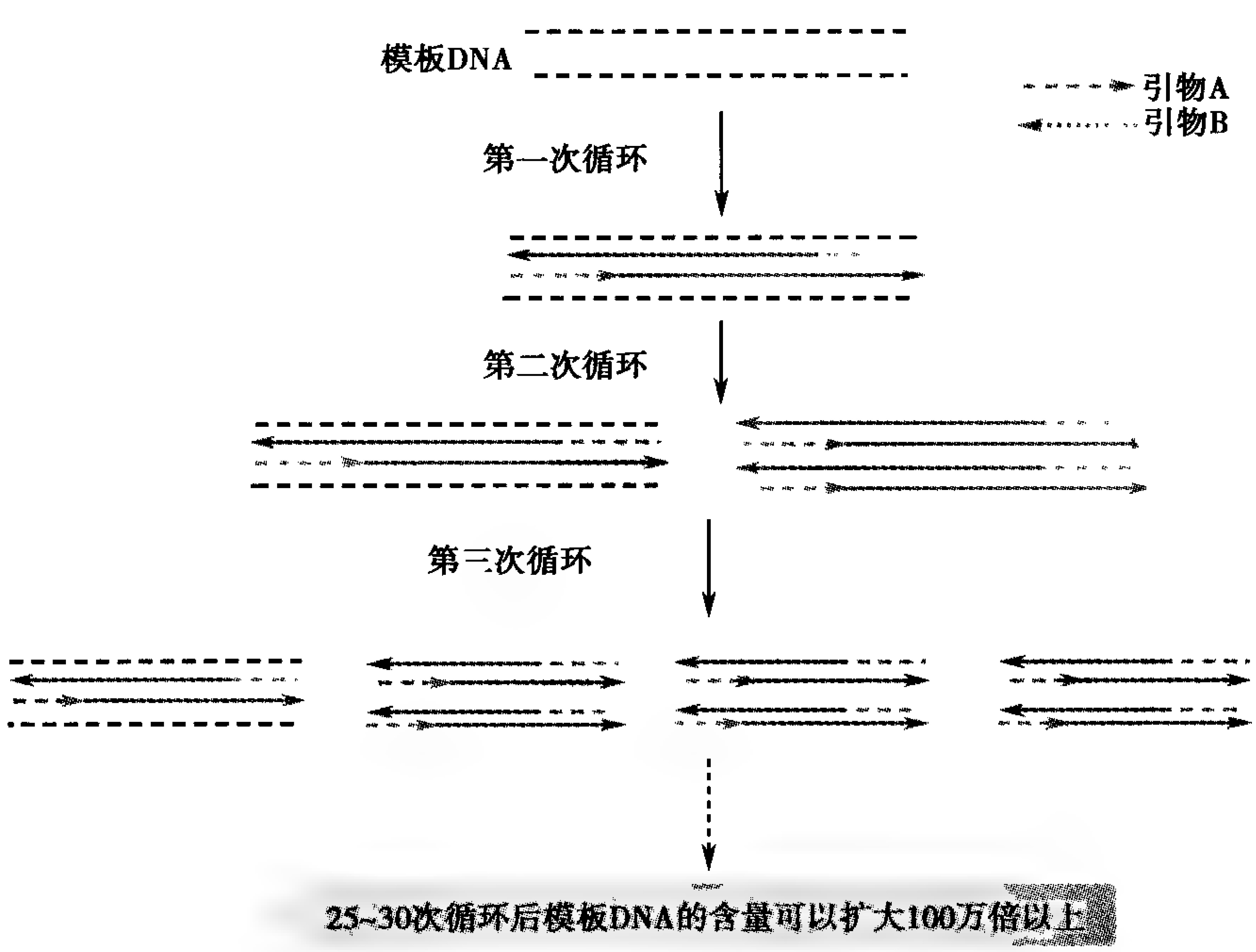
除上述 3 种印迹技术外，还有一些其他方法可用于核酸和蛋白质的分析。例如，可以不经电泳分离而直接将样品点在 NC 膜上用于杂交分析，这种方式被称为斑点印迹（dot blot）；组织切片或细胞涂片可以直接用于杂交分析，称为原位杂交（in situ hybridization）；可以将多种已知序列的 DNA 排列在一定大小的尼龙膜或其他支持物上用于检测细胞或组织样品中的核酸种类，这种技术称为 DNA 芯片技术（见本章第五节）。

第二节　PCR 技术的原理与应用

PCR（polymerase chain reaction）的中文全称为聚合酶链反应，应用这一技术可以将微量的目的 DNA 片段大量扩增。它的高敏感、高特异、高产率、可重复以及快速简便等优点使其迅速成为分子生物学研究中应用最为广泛的方法，许多以往无法解决的分子生物学研究难题得以解决。

一、PCR 技术的工作原理

PCR 法以拟扩增的 DNA 分子为模板，以 1 对与模板互补的寡核苷酸片段为引物，在 DNA 聚合酶作用下，依半保留机制沿模板链延伸直至完成 2 条新链合成。重复这一过程，即可使目的 DNA 片段得到扩增（图 21-2）。组成 PCR 反应体系的基本成分包括模板 DNA、特异引物、耐热性 DNA 聚合酶（如 *Taq* DNA 聚合酶）、dNTP 以及含有 Mg^{2+} 的缓冲液。



●图 21-2　PCR 技术原理示意图

PCR 的基本反应步骤包括：

（1）变性：将反应体系加热至 95℃，使模板 DNA 完全变性成为单链，同时引物自身以及引物之间存在的局部双链也得以消除。

（2）退火：将温度下降至适宜温度（一般较 T_m 低 5℃）使引物与模板 DNA 结合。

（3）延伸：将温度升至 72℃，DNA 聚合酶以 dNTP 为底物催化 DNA 的合成反应。

上述三个步骤称为一个循环，新合成的 DNA 分子继续作为下一轮合成的模板，经多次循环（25～30 次）后即可达到扩增 DNA 片段的目的。

PCR 方法的发明

1983 年 4 月，27 岁的美国科学家 K. B. Mullis 开车去度周末，路上思考着用 Sanger 法做 DNA 序列分析时，是否可以在目的基因下游互补链上增加 1 条引物，使得两条链的分析结果可以相互确认？问题是，如果反应过于迅速而合成了新链全长，就无法进行序列分析了。此刻，Mullis 突然意识到，重复这一反应无疑将使位于两个引物之间的特异性序列得到扩增。他仅用了数月时间进行试验，就成功建立了 PCR 技术，并在 1993 年获得诺贝尔化学奖。T. Appenzella 在颁奖典礼上称赞 Mullis 的想象力，他指出："PCR 确实仅仅是实验中的一个小技巧。虽然其中的知识和智慧含量似乎并不丰富，但是毕竟没有人能够更早发明它，而且 PCR 技术对于分子生物学的影响远远超过了其他所有的技术"。

二、PCR 技术的主要用途

（一）目的基因的克隆

PCR 技术为在重组 DNA 过程中获得目的基因片段提供了简便快速的方法。该技术可用于：①利用特异性引物以 cDNA 或基因组 DNA 为模板获得已知目的基因片段，或与逆转录反应相结合，直接以组织和细胞的 mRNA 为模板获得目的片段；②利用简并引物从 cDNA 文库或基因组文库中获得序列相似的基因片段；③利用随机引物从 cDNA 文库或基因组文库中克隆基因。

（二）基因的体外突变

在 PCR 技术建立以前，在体外对基因进行各种突变是一项费时费力的工作。现在，利用 PCR 技术可以随意设计引物在体外对目的基因片段进行嵌和、缺失、点突变等改造。

（三）DNA 和 RNA 的微量分析

PCR 技术高度敏感，对模板 DNA 的量要求很低，是 DNA 和 RNA 微量分析的最好方法。理论上讲，只要存在 1 分子的模板，就可以获得目的片段。实际工作中，1 滴血液、1 根毛发或 1 个细胞已足以满足 PCR 的检测需要，因此在基因诊断方面具有极广阔的应用前景。

（四）DNA 序列测定

将 PCR 技术引入 DNA 序列测定，使测序工作大为简化，也提高了测序的速度。待测 DNA 片段既可克隆到特定的载体后进行序列测定，也可直接测定。

（五）基因突变分析

PCR 与其他技术的结合可以大大提高基因突变检测的敏感性，例如单链构象多态性分析、等位基因特异的寡核苷酸探针分析、基因芯片技术等。

三、几种重要的 PCR 衍生技术

PCR 技术自身的发展及其与已有分子生物学技术的结合形成了多种 PCR 衍生技术，

提高了 PCR 反应的特异性和应用的广泛性。本章仅举例介绍部分与医学研究密切相关的 PCR 衍生技术。

（一）逆转录 PCR 技术

逆转录 PCR（reverse transcription PCR，RT-PCR）是将 RNA 的逆转录反应和 PCR 反应联合应用的一种技术。即首先以 RNA 为模板，在逆转录酶的作用下合成 cDNA，再以 cDNA 为模板通过 PCR 反应来扩增目的基因。RT-PCR 是目前从组织或细胞中获得目的基因以及对已知序列的 RNA 进行定性及半定量分析的最有效方法。

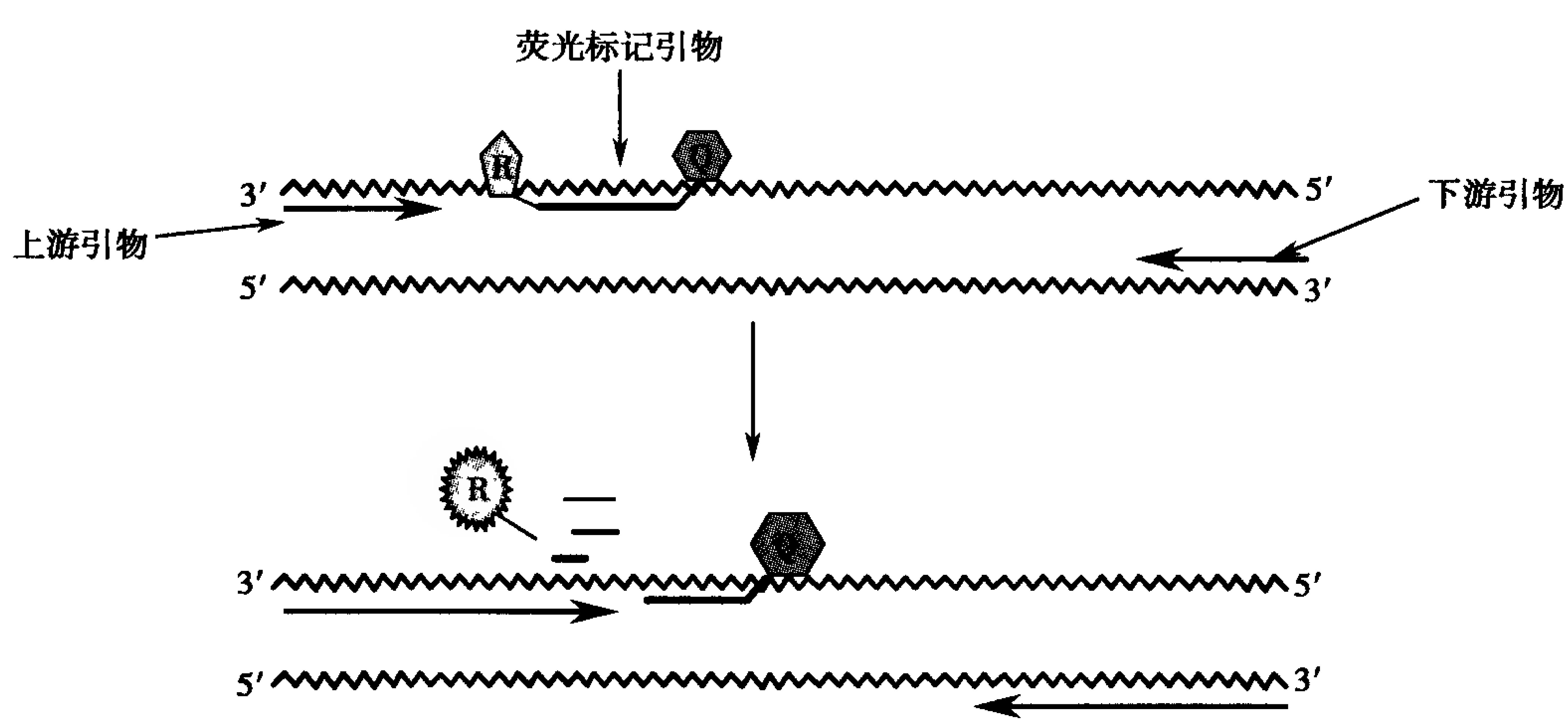
（二）原位 PCR 技术

原位 PCR（in situ PCR）是在甲醛溶液（福尔马林）固定、石蜡包埋的组织切片或细胞涂片上的单个细胞内进行的 PCR 反应，然后用特异性探针进行原位杂交，即可检出待测 DNA 或 RNA 是否在该组织或细胞中存在。由于常规 PCR 或 RT-PCR 技术的产物不能在组织细胞中直接定位，因而不能与特定的组织细胞特征表型相联系，而原位杂交技术虽有良好的定位效果，但由于检测的灵敏度不高。原位 PCR 方法弥补了 PCR 技术和原位杂交技术的不足，是将目的基因的扩增与定位相结合的一种最佳方法。

（三）实时 PCR 技术

常规 PCR 反应中产物以指数形式增加，在比较不同来源样品的 DNA 或 cDNA 含量时，产物的堆积将影响对检测样品中原有模板含量差异的准确判断，因而只能作为半定量手段应用。实时 PCR（real-time PCR）技术通过动态监测反应过程中的产物量，消除了产物堆积对定量分析的干扰，亦被称为定量 PCR。

实时 PCR 的基本原理是引入了荧光标记分子，并使荧光信号强度与 PCR 产物量成正比，对每一反应时刻的荧光信号进行实时分析，计算出 PCR 产物量。根据动态变化数据，可以精确计算出样品中最初的含量差异（图 21-3）。与传统 PCR 反应相比，在常规正向和反向引物之间，实时 PCR 反应增加了一特殊引物作为探针。探针的 5′-端有一个荧光报告分子（reporter，R），3′-端有一个荧光淬灭分子（Quencher，Q）。没有扩增反应时，探针保持完整，荧光报告分子和荧光淬灭分子同时存在于探针上，无荧光信号释放。随着 PCR 的进行，*Taq* DNA 聚合酶在链延伸过程中遇到与模板结合着的荧光探针，其 5′→3′核酸外切酶就会将该探针逐步切断，报告荧光基团一旦与淬灭基团分离，便产生荧光信号。后者被荧光监测系统接收，用于数据分析。



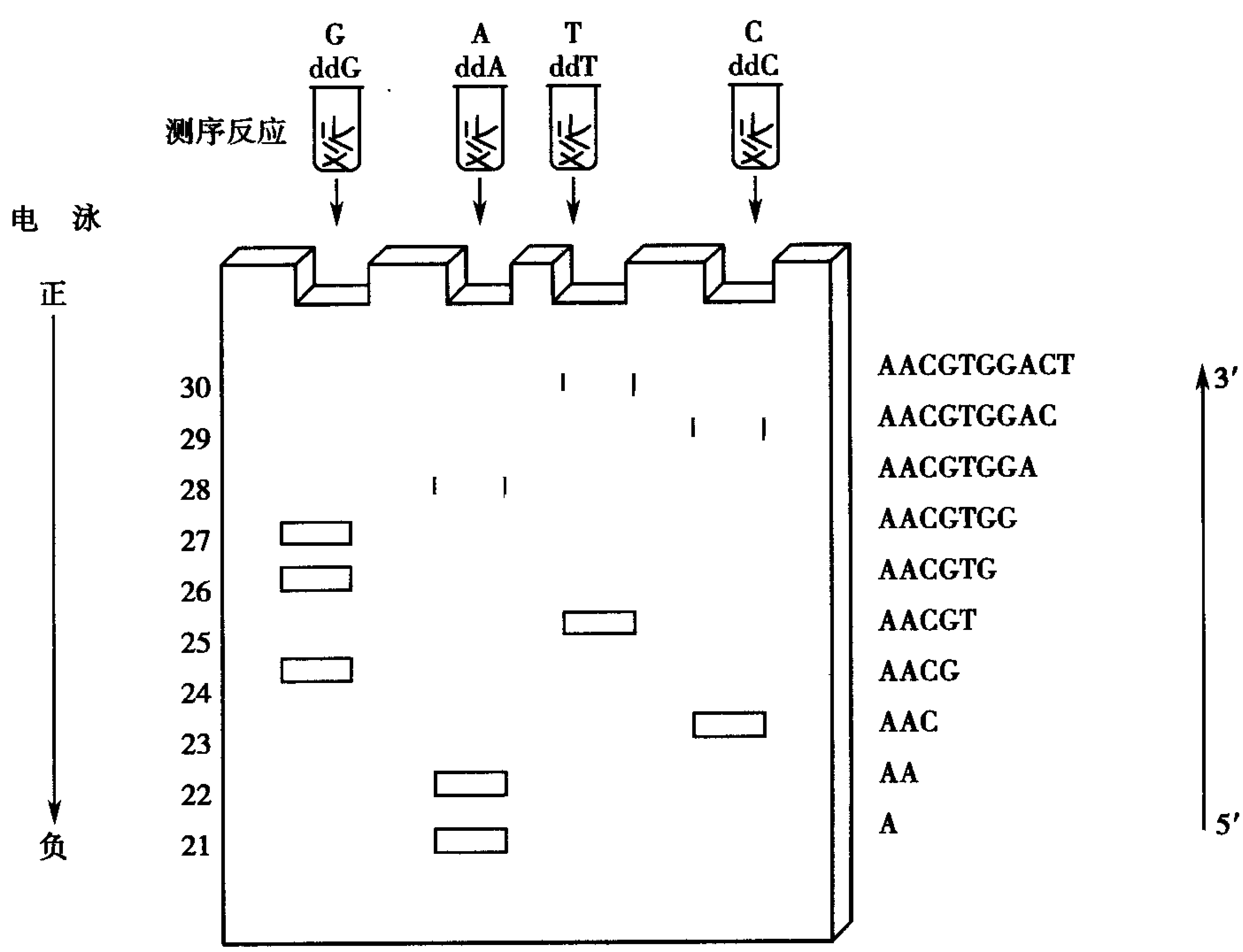
●图 21-3　实时 PCR 原理示意图

第三节 核酸序列分析

DNA 碱基序列分析对于了解基因的编码方式无疑十分重要。最初，人们用部分酶解等方法仅能测定 RNA 的序列。1965 年，R. Holley 花了 7 年时间才完成了酵母丙氨酰-tRNA 的 76 个核苷酸的序列测定。如今，一个最小的 DNA 序列自动分析仪 24 小时内也可完成约 10000 个碱基序列的测定工作。目前无论是手工测定还是自动化测定 DNA 序列的技术都建立在 A. Maxam 和 W. Gilbert 的化学裂解法和 F. Sanger 的 DNA 链末端合成终止法的基础上。本节仅介绍后者。

一、DNA 链末端合成终止法

DNA 链末端合成终止法也称为 Sanger 法。它的基本原理是将 2′，3′-双脱氧核苷酸（ddNTP）参入到新合成的 DNA 链中，由于参入的 ddNTP 缺乏 3′-羟基，因此不能与下一位核苷酸反应形成磷酸二酯键，DNA 合成反应即终止。在测定时，首先将模板分为 4 个反应管，分别加入引物和 DNA 聚合酶，将 ^{32}P 或 ^{35}S 标记的 dNTP（仅标记一种即可）作为底物参入到新合成的 DNA 链中。反应一定时间后，每一管内加入 4 种 ddNTP 中的一种，就可获得一系列在不同部位终止的、大小不同的 DNA 片段。经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离这些片段，再通过放射自显影就可以读出 DNA 的序列（图 21-4）。

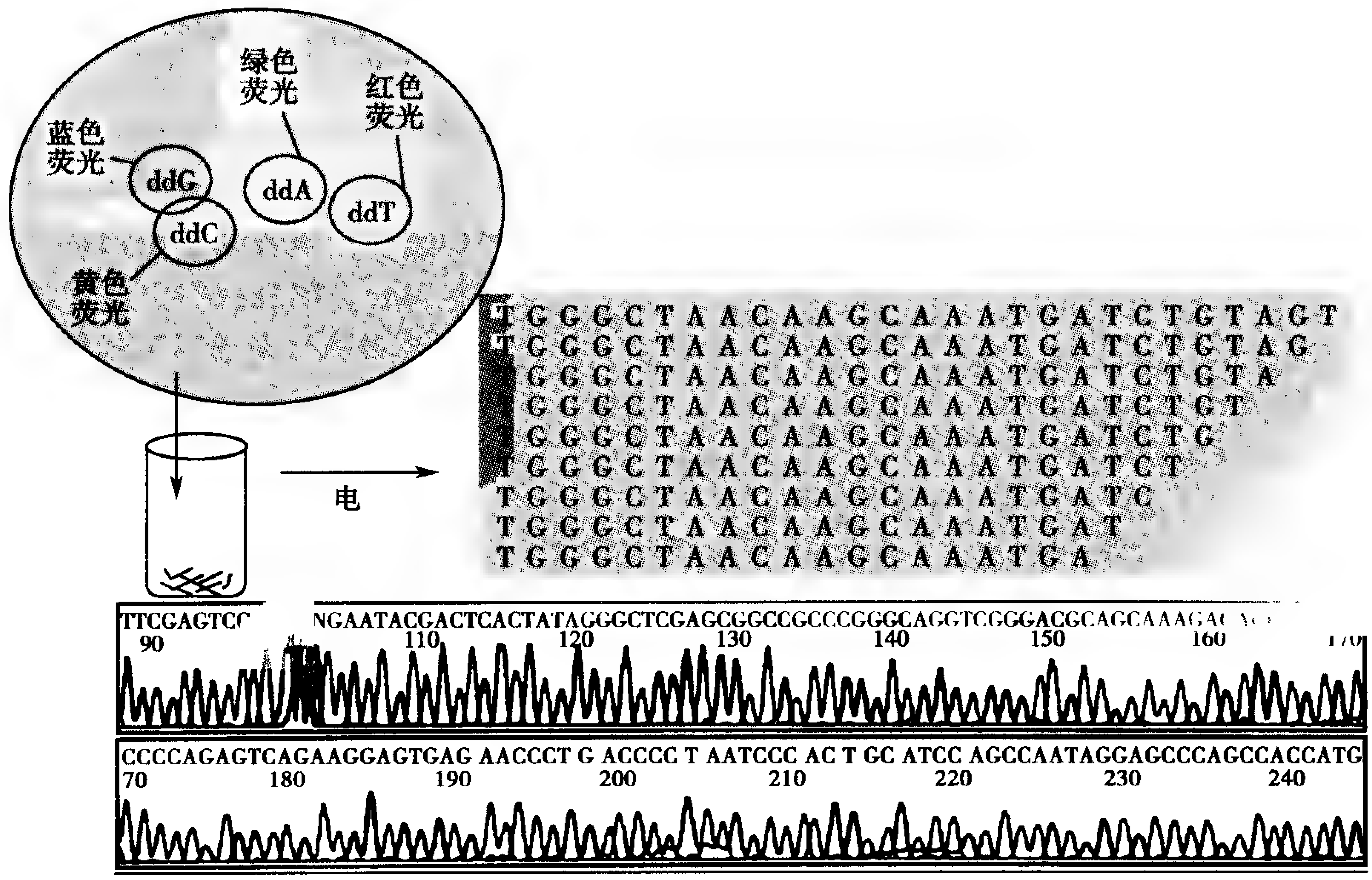


● 图 21-4 链末端合成终止法测定 DNA 序列的原理及结果示意

二、DNA 自动测序

采用荧光替代放射性核素标记是实现 DNA 序列分析自动化的基础。用不同荧光分子

标记 4 种双脱氧核苷酸，然后进行 Sanger 测序反应，反应产物经电泳（平板电泳或毛细管电泳）分离后，用激光激发使之发射出 4 种不同波长荧光，检测器采集不同大小 DNA 片段上的荧光信号，并依此确定 DNA 碱基的排列顺序（图 21-5）。



● 图 21-5　DNA 序列自动分析原理及结果图

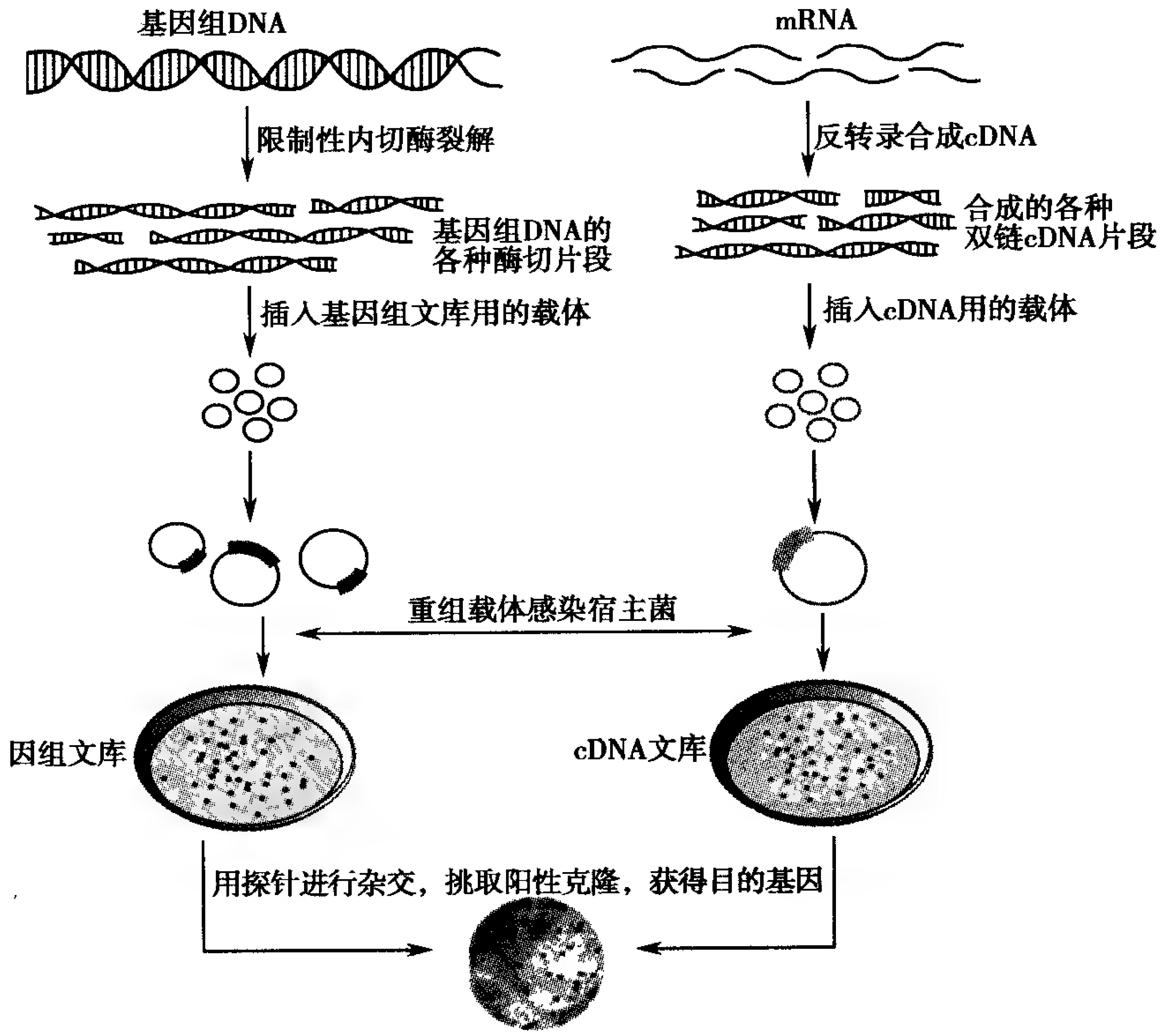
1987 年，商品化自动 DNA 测序仪问世。随着人类基因组计划的实施和需求，DNA 序列分析自动化得到了迅速发展，目前已经完全取代了手工测序。

第四节　基 因 文 库

基因文库（gene library）是指一个包含了某一生物体全部 DNA 序列的克隆群体。基因文库可分为基因组 DNA 文库（genomic DNA library）和 cDNA 文库（cDNA library）。当我们要对某一基因的结构和功能进行研究时，首先要获得这个基因，最简捷的方法之一就是从基因文库中获得基因。

一、基因组 DNA 文库

基因组 DNA 文库以 DNA 片段的形式贮存着某一生物的全部基因组 DNA（包括所有的编码区和非编码区）信息。基因组 DNA 文库的构建过程是将纯化的细胞基因组 DNA 用适当的限制性内切酶消化，获得一定大小的 DNA 片段（20kb 左右），将这些片段克隆到噬菌体载体中，从而获得一群含有不同 DNA 片段的噬菌体，这就是基因组文库。噬菌体基因组文库经过体外包装再转化细菌可获得扩增（图 21-6）。基因组文库所包含的噬菌体克隆数，代表着基因组 DNA 片段的种类数。根据计算，以 λ 噬菌体为载体的人基因组 DNA 文库的克隆数目至少应在 10^6 个以上，方可认为该文库包含了 99％的基因组 DNA 序列。用于构建基因组文库的载体有 λ 噬菌体、黏粒和酵母人工染色体等。



●图 21-6 基因组文库和 cDNA 文库的构建和筛选

从基因组文库中筛选目的基因可以通过核酸分子杂交的方法进行，即用放射性核素标记已知序列的 DNA 片段，后者与基因组文库中的所有克隆进行杂交，经放射自显影选出阳性克隆，获得目的基因。

二、cDNA 文库

cDNA 文库是包含某一组织细胞在一定条件下所表达的全部 mRNA 经逆转录而合成的 cDNA 序列的克隆群体，它以 cDNA 片段的形式贮存着该组织细胞的基因表达信息。cDNA 文库的构建是将组织细胞中的 mRNA 经过逆转录合成 cDNA，后者被克隆进入质粒或噬菌体载体，转化宿主细胞后可获得克隆群体（图 21-6）。cDNA 文库的容量应足够大，一般克隆数在 10^6 以上的 cDNA 文库才有可能包含来自于细胞内含量很低（低丰度）的 mRNA 的信息。

从 cDNA 文库中筛选含有目的基因的克隆也可以用核酸分子杂交方法进行。另外，用表达型载体（可以在宿主菌内表达插入基因）构建的 cDNA 文库还可以利用特异性抗体或特异性结合蛋白筛选目的基因。

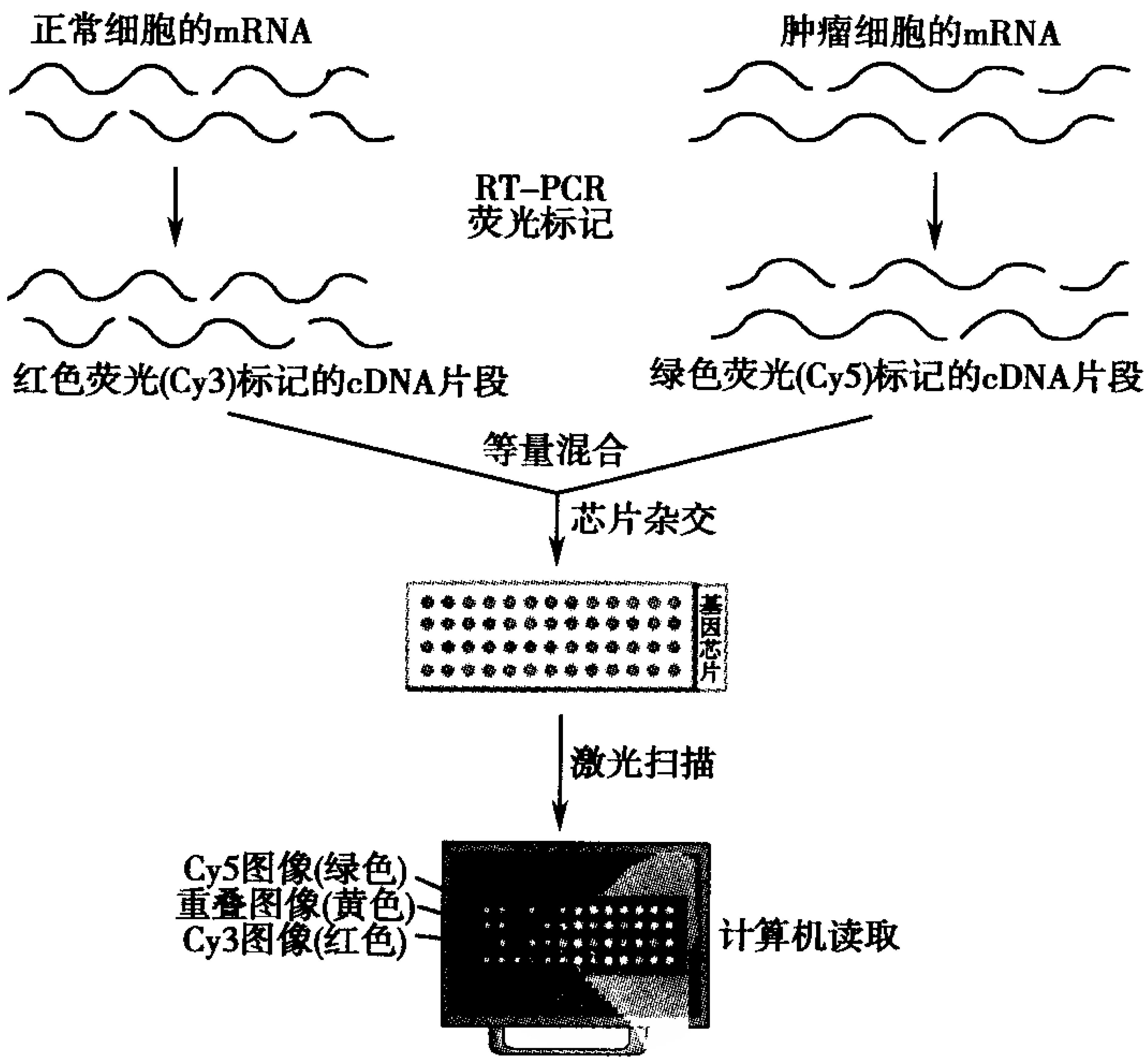
第五节 生物芯片技术

生物芯片技术是在 20 世纪末发展起来的一项新的规模化生物信息分析技术，目前已被应用于生命科学的众多领域。这些应用包括基因表达检测、基因突变检测、基因诊断、功能基因组研究、基因组作图和新基因发现等多个方面。

一、基因芯片

基因芯片（gene chip）是指将许多特定的DNA片段有规律地紧密排列固定于单位面积的支持物上，然后与待测的荧光标记样品进行杂交，杂交后用荧光检测系统等对芯片进行扫描，通过计算机系统对每一位点的荧光信号做出检测、比较和分析，从而迅速得出定性和定量的结果。该技术亦被称作DNA微阵列（DNA microarray）。基因芯片可在同一时间内分析大量的基因，高密度基因芯片可以在1cm^{2}面积内排列20000个基因用于分析，实现了基因信息的大规模检测。

基因芯片特别适用于分析不同组织细胞或同一细胞不同状态下的基因差异表达情况，其原理是基于双色荧光探针杂交。该系统将两个不同来源样品的mRNA逆转录合成cDNA时用不同的荧光分子（如正常用红色、肿瘤用绿色）进行标记（图21-7），标记的cDNA等量混合后与基因芯片进行杂交，在两组不同的荧光下检测，获得两个不同样品在芯片上的全部杂交信号。呈现绿色荧光的位点代表该基因只在肿瘤组织表达，呈现红色信号的位点代表该基因只在正常组织表达，呈现两种荧光互补色——黄色的位点则表明该基因在两种组织中均有表达。



● 图21-7　基因芯片工作流程示意图

二、蛋白质芯片

蛋白质芯片（protein chip）是将高度密集排列的蛋白质分子作为探针点阵固定在固相支持物上，当与待测蛋白样品反应时，可捕获样品中的靶蛋白，再经检测系统对靶蛋白进行定性和定量分析的一种技术。蛋白质芯片的基本原理是蛋白质分子间的亲和反应，例如抗原-抗体或受体-配体之间的特异性结合。最常用的探针蛋白是抗体。在用蛋白质芯片检测时，首先要将样品中的蛋白质标记上荧光分子，经过标记的蛋白质一旦结合到芯片上就

会产生特定的信号，通过激光扫描系统来检测信号。

蛋白质芯片技术具有快速和高通量等特点，它可以对整个基因组水平的上千种蛋白质同时进行分析，是蛋白质组学研究的重要手段之一，已广泛应用于蛋白质表达谱、蛋白质功能和蛋白质间的相互作用的研究。在临床疾病的诊断和新药开发的筛选上也有很大的应用潜力。

第六节　生物大分子相互作用研究技术

生物大分子之间可相互作用并形成各种复合物，所有的重要生命活动，包括 DNA 的复制、转录、蛋白质的合成与分泌、信号转导和代谢等，都是由这些复合物所完成。研究细胞内各种生物大分子的相互作用方式，分析各种蛋白质、蛋白质-DNA、蛋白质-RNA 复合物的组成和作用方式是理解生命活动基本机制的基础。有关研究技术发展迅速，本节选择介绍部分方法的原理和用途。

一、蛋白质相互作用研究技术

目前常用的研究蛋白质相互作用的技术包括酵母双杂交、各种亲和分析（亲和色谱、免疫共沉淀、标签蛋白沉淀等）、荧光共振能量转换效应分析、噬菌体显示系统筛选等。本部分简要介绍标签蛋白（tagged protein）沉淀和酵母双杂交技术（yeast two-hybrid system）。

（一）标签蛋白沉淀

标签融合蛋白结合实验是一个基于亲和色谱原理的、分析蛋白质体外直接相互作用的方法。该方法利用一种带有特定标签（tag）的纯化融合蛋白作为钓饵，在体外与待检测的纯化蛋白温育，然后用可结合蛋白标签的琼脂糖珠将融合蛋白沉淀回收，洗脱液经电泳分离并染色。如果两种蛋白有直接的结合，待检测蛋白将与融合蛋白同时被琼脂糖珠沉淀（pull-down），在电泳胶中见到相应条带（图 21-8）。

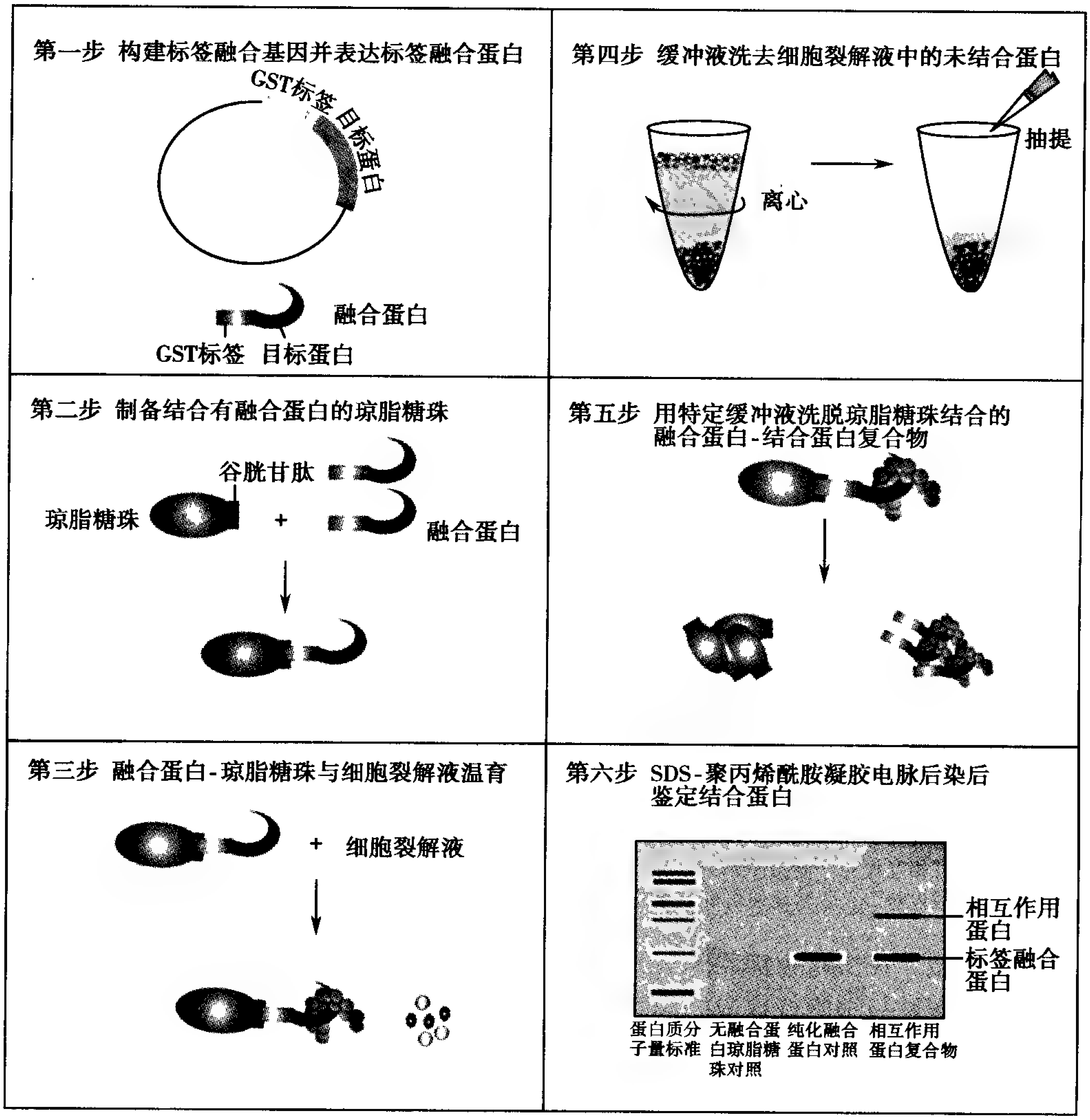
目前最常用的标签是谷胱甘肽 S-转移酶（GST），有各种商品化的载体用于构建 GST 融合基因，并在大肠杆菌中表达为 GST 融合蛋白。利用 GST 与还原型谷胱甘肽（glutathione）的结合作用，可以用共价偶联了还原型谷胱甘肽琼脂糖珠一步纯化 GST 融合蛋白。另一个常用的易于用常规亲和色谱方法纯化的标签分子是可以与镍离子琼脂糖珠结合的 6 组氨酸（6xHis）标签。

标签融合蛋白结合实验主要用于证明两种蛋白分子是否存在直接的物理结合，分析两种分子结合的具体结构部位及筛选细胞内与融合蛋白相结合的未知分子。

（二）酵母双杂交技术的原理和用途

酵母双杂交系统目前已经成为分析细胞内未知蛋白质相互作用的主要手段之一。该技术的建立是基于对酵母转录激活因子 GAL4 分子的认识。GAL4 分子的 DNA 结合区（binding domain，BD）和促进转录的活性区（activation domain，AD）被分开后将丧失对下游基因表达的激活作用，但是如果 BD 和 AD 分别融合了具有配对相互作用的两种蛋白质分子后，就可以依靠所融合的蛋白质分子之间的相互作用而恢复对下游基因的表达激活作用。具体工作方式如图 21-9 所示。

酵母双杂交系统可以用于：①证明两种已知基因序列的蛋白质可以相互作用的生物信息学推测；②分析已知存在相互作用的两种蛋白质分子的相互作用、功能结构域或关键的氨基酸残基；③将拟研究的蛋白质的编码基因与 BD 基因融合成为“诱饵”表达质粒，可



●图 21-8　标签融合蛋白沉淀实验流程示意图

以筛选 AD 基因融合的“猎物”基因表达文库，筛选未知的相互作用蛋白质。

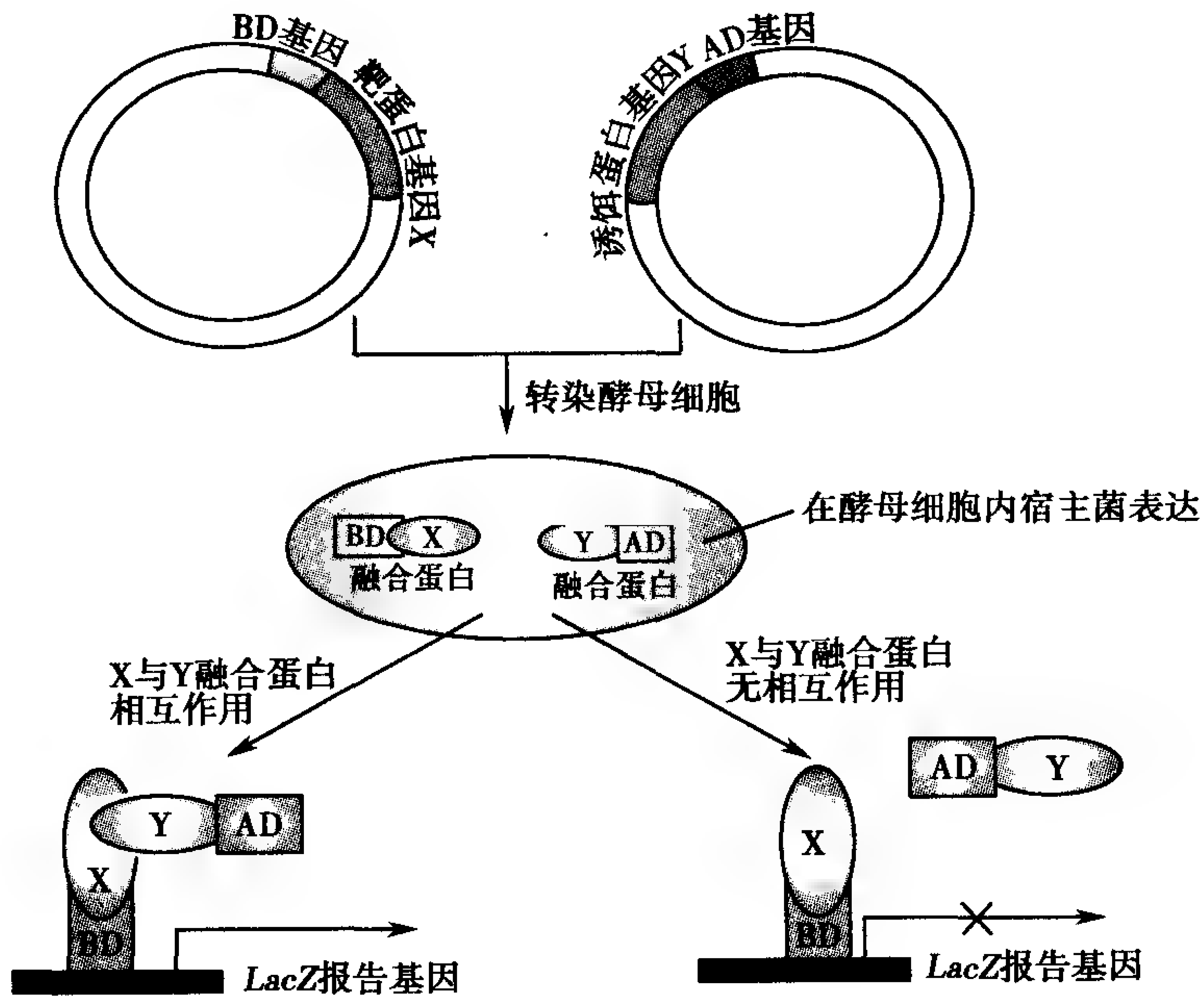
二、DNA-蛋白质相互作用分子分析技术

蛋白质与 DNA 相互作用是基因表达及其调控的基本机制，分析各种转录因子所结合的特定 DNA 序列及基因的调控序列所结合的蛋白质，是阐明基因表达调控机制的主要研究内容。这里介绍两种目前常用的研究 DNA 与蛋白质相互作用的技术。

（一）电泳迁移率变动测定

电泳迁移率变动测定（electrophoretic mobility shift assay，EMSA）或称凝胶迁移变动实验（gel shift assay）最初用于研究 DNA 结合蛋白与相应 DNA 序列间的相互作用，可用于定性和定量分析，已经成为转录因子研究的经典方法。目前这一技术也被用于研究 RNA 结合蛋白和特定 RNA 序列间的相互作用。

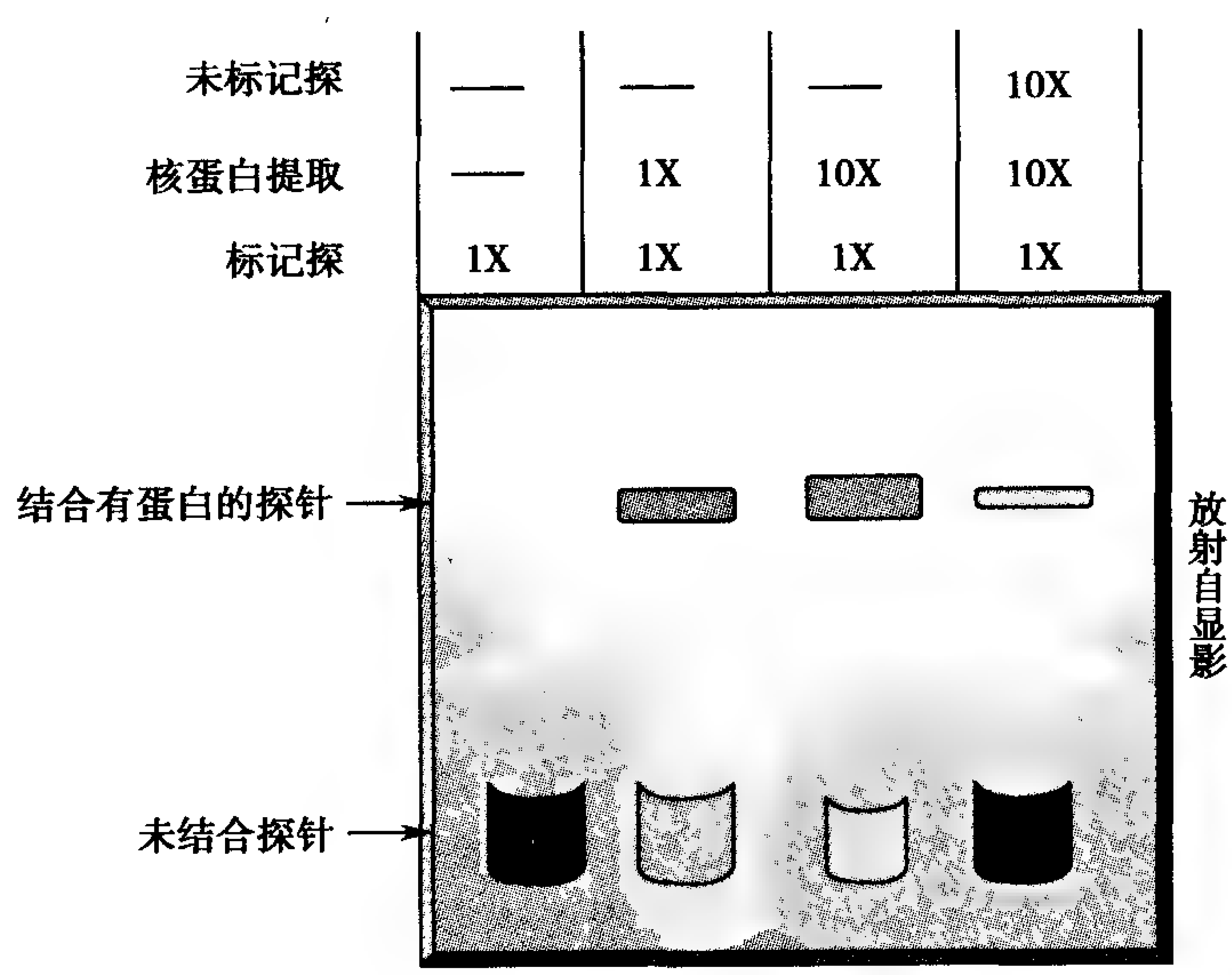
EMSA 的基本原理是利用蛋白质的结合将增大特定寡核苷酸探针分子量，在凝胶中的电泳速度将慢于游离探针这一现象，即表现为条带相对滞后（图 21-10）。因此，也常被称



● 图 21-9 酵母双杂交系统分析蛋白质相互作用的原理

将编码蛋白 X 的 DNA 序列与 GAL4 分子的 BD 基因融合成诱饵（bait）基因；将编码蛋白 Y 的 DNA 序列与 GAL4 分子的 AD 基因融合成猎物（prey）基因。在 GAL4 调控启动子的下游融合有报告基因，报告基因的产物是 β-半乳糖苷酶，用其底物 β-Gal 反应可以进行颜色筛选。当用两个融合基因同时转化酵母细胞时，如果 X 蛋白和 Y 蛋白不存在相互作用，就不能激活报告基因的转录；如果 X 和 Y 可相互作用，便会使 BD 和 AD 靠近重新形成一个有效的转录激活因子。通过检测报告基因是否转录便可确定蛋白 X 与蛋白 Y 是否有相互作用

为凝胶阻滞实验。在实验中需要预先用放射性核素或生物素标记待检测的寡核苷酸探针，再将标记好的探针与细胞核提取物温育一定时间使其形成 DNA-蛋白质复合物，然后将温育后的反应液进行非变性（不加 SDS，以免形成的复合物解离）聚丙烯凝胶酰胺电泳，最后用放射自显影或酶反应显示标记 DNA 探针的条带位置（图 21-10）。

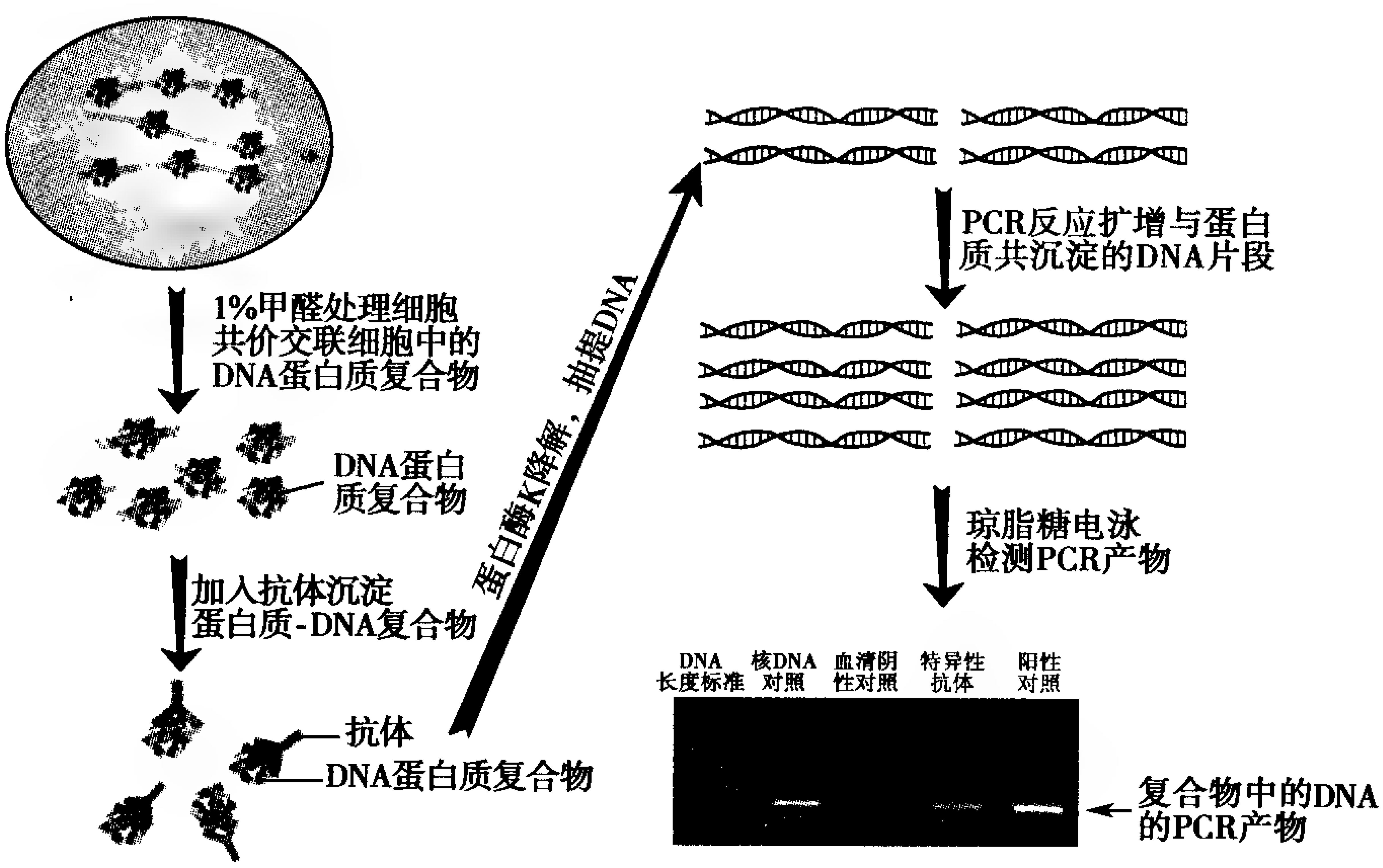


● 图 21-10 凝胶迁移实验结果示意图

如果细胞核提取物中不存在可与标记探针 DNA 结合的蛋白质（如特异的转录因子），那么所有标记探针都将集中出现在凝胶的前沿（底部），如有 DNA-蛋白质复合物的形成，标记探针 DNA 条带就将出现在较靠近凝胶顶部的位置。为证明所检测到的 DNA-蛋白质复合物的特异性，可以加入足量的未标记探针，这些未标记探针将与标记探针竞争特异结合的蛋白质，原有的滞后 DNA-蛋白质复合物条带将消失。用于竞争的未标记探针也被称为竞争 DNA（competitor DNA）。

（二）染色质免疫沉淀法

真核生物的基因组 DNA 以染色质的形式存在。因此，研究蛋白质与 DNA 在染色质环境下的相互作用是阐明真核生物基因表达机制的重要途径。染色质免疫沉淀技术（chromatin immunoprecipitation assay，ChIP）是目前可以研究体内 DNA 与蛋白质相互作用的主要方法。它的基本原理是在活细胞状态下用化学交联试剂固定蛋白质-DNA 复合物，并将其随机切断为一定长度范围内的染色质小片段，然后通过免疫学方法沉淀此复合体，再利用 PCR 技术特异性地富集目的蛋白结合的 DNA 片段（图 21-11），从而获得蛋白质与 DNA 相互作用的信息。



● 图 21-11 染色质免疫沉淀实验流程及结果示意

近年来，人们将 ChIP 和芯片技术结合在一起，建立了 ChIP 芯片（ChIP-chip）技术。该方法是在全基因组范围筛选与特定蛋白相结合的 DNA 序列，即鉴定特定核蛋白的 DNA 结合靶点的一项新技术。

第七节 遗传修饰动物模型的建立及应用

一、转基因技术

基因转移技术的发展使得人们不仅可以在细胞水平进行基因转移，而且可以使目的基因整合入受精卵细胞或胚胎干细胞，然后将细胞导入动物子宫，使之发育成个体。这种个体能够把目的基因继续传给子代，被导入的目的基因称为转基因（transgene），目的基因的受体动物称为转基因动物（transgenic animal）。现已建立了转基因小鼠、转基因羊和转

基因大鼠等多种动物模型。

二、核转移技术

核转移技术即所谓动物克隆技术。1996 年，克隆羊多莉的诞生成为当年分子生物学发展中的最重大事件。核转移技术是将动物的一个体细胞胞核导入另一个体的去除了胞核的激活的卵细胞内，使之发育成个体。这样的个体所携带的遗传性状仅来自一个父亲或母亲个体，因而为无性繁殖。从遗传角度上讲，是一个个体的完全的拷贝，故称之为克隆(clone)。

三、基因剔除技术

对基因表达的整体人工干预不仅限于表达某种目的基因，也可以专一地去除某种目的基因。这种有目的地去除动物体内某种基因的技术称为基因剔除（gene knock out）或基因靶向灭活（gene targeting)，其基本原理是建立在同源重组技术上。这种基因靶向灭活技术可以在细胞水平进行，从而建立新的细胞系；也可以在整体水平进行用以建立基因剔除动物。它的基本方式是将灭活的基因放入胚胎干细胞（embryonic stem cell，ES 细胞）中，使这一灭活基因通过同源重组取代原有的目的基因，筛选到基因已定点灭活的细胞后，通过显微注射将细胞注入小鼠囊胚中。细胞在小鼠囊胚中参与胚胎的发育，最终形成嵌合体小鼠。由于嵌合小鼠的一部分生殖细胞是来源于 ES 细胞的，所以通过小鼠培育即可获得纯合子基因剔除小鼠。

四、基因转移和基因剔除在医学发展中的作用

基因转移技术和基因剔除技术在探讨每一种基因产物的正常功能方面具有重要的作用，同时对于医学的发展也具有重大的推动作用。这两项技术在医学中最重要的用途是建立疾病动物模型，这些动物模型可以用于探讨疾病的发生机制，更为重要的是可以作为新的治疗方法和新的药物的筛选系统。以往的可遗传疾病动物模型主要是自然发生或用化学药物、放射诱导等方式获得，转基因技术和基因剔除技术为直接建立这些动物模型提供了有效的手段。

这些动物模型有的是单基因决定疾病，其中一些疾病是某些基因失活（loss of function mutations）的结果。因此最简单的制作疾病动物模型的方式是进行基因剔除以模拟基因失活。目前用此法建立的疾病模型包括 β-地中海贫血、高脂蛋白血症、动脉硬化症和阿尔茨海默病等。还有一些疾病是由单一基因的突变所造成，因此，可以在动物导入该突变基因而建立疾病模型，称为获得性突变（gain of function mutation)。这一技术已在一些神经退行性疾病模型的建立上获得成功。肿瘤、高血压、糖尿病等疾病是多基因遗传性疾病，且有环境因素的强烈影响，目前也在吸引人们建立各种模型系统。

第八节 疾病相关基因的克隆与鉴定

人类携带的各种有害基因可以导致疾病的发生。20 世纪 80 年代以前鉴定出的疾病相关基因仅限于个别功能异常非常明确、基因表达产物的纯化较为容易的遗传性疾病，如镰刀状贫血等，其他致病基因的研究一直难以取得突破。20 世纪 80 年代中期以后，随着分

子生物学技术的发展，尤其是 PCR 技术的广泛应用和人类基因组测序的完成，使得疾病相关基因的鉴定与克隆工作得以迅速发展。

并非所有人类的基因均可成为致病基因，一些对于发育十分重要的基因功能的丧失会导致胚胎期死亡。另外，亦有许多基因的突变不会发生疾病，因为不同基因的产物在功能上可能相互代偿。同时，也应该注意到，致病基因与疾病表型并非一对一的关系，同一基因的不同突变可以引起不同表型，同一疾病表型也可能由不同基因突变所引起。高血压、糖尿病、某些恶性肿瘤等的遗传往往是多基因决定的，研究上也相当困难。这里仅介绍单基因致病情况下的致病基因克隆。目前克隆致病相关基因主要有如下两种策略：

一、功能克隆

功能克隆（functional cloning）是指从对基因编码产物的功能的了解出发来克隆致病基因。主要用于某些生物化学机制已经明确，缺陷蛋白较易得到部分纯化的遗传性疾病分析。在这种情况下，获得部分纯化的蛋白质后可以进一步克隆其编码基因，经序列测定、功能分析并与正常比较便可确定致病基因的变异所在。随着人类基因组计划的完成，已经可以直接在数据库中搜索相应的基因了。

另外，酵母系统也可以用来从功能学角度出发鉴定致病基因。酵母系统易于操作，基因的突变表型易于确认，如果用不同人的 DNA 片段转化与人类遗传疾病具有类似表型的突变酵母，可以恢复（rescue）正常表型的片段中所含有的基因即可能为致病基因。这种实验称为功能互补实验（functional complementation assay），一些哺乳类动物细胞系也可用于功能互补实验。

二、定位克隆

定位克隆（positional cloning）是指从一种致病基因的染色体定位出发逐步缩小范围，最后克隆该基因。实现从染色体定位到基因克隆是 20 世纪 80 年代医学分子生物学的重要进展之一。

系统的定位克隆工作包含遗传学分析和分子生物学分析两部分。遗传学分析方法包括交换分析和连锁不平衡分析，以确定致病基因的染色体定位。分子生物学分析包括染色体异常（缺失、易位等）分析和基因文库的筛选与基因克隆。以杜氏肌营养不良（Duchenne muscular dystrophy，DMD）致病基因的克隆为例，首先通过遗传学的家族连锁分析确定了致病基因位于染色体 Xp21，接着将一个 Xp21 区带缺失的病人的 DNA 与正常人的 DNA 进行杂交，减去可发生杂交的相同基因序列，最后剩余的序列即为病人所缺失的基因，该基因的产物被命名为肌营养不良蛋白（dystrophin）。

人类基因组计划的完成提供了新的遗传标志，使得致病基因的定位克隆日益迅速和方便。基于微卫星遗传标记和 PCR 技术所建立的全基因组扫描技术（genome-wide linkage mapping），已有商品化试剂盒出售，配之以软件分析，可以迅速根据个体及家系间微卫星重复序列的多态性来定位致病基因所在的染色体，并进一步确定基因在染色体上的具体位置，最后确定致病基因。

鉴定疾病相关基因已经成为医学分子生物学的研究热点和重点，在对单基因决定的遗传性疾病有所认识的基础上，多基因遗传及环境与遗传相互作用所导致的疾病如糖尿病、高血压及肿瘤等亦逐步为人们所重视。这些研究将为认识疾病的发病机制提供极为重要的线索，为诊断和治疗带来革命性的变化。

第九节 基因诊断和基因治疗

人类的绝大多数疾病都与基因变异密切相关。从基因水平探测、分析病因及疾病的发病机制，并采用针对性的手段矫正疾病紊乱状态，是医学发展的新方向。基因诊断（gene diagnosis）和基因治疗（gene therapy）已成为现代分子医学的重要内容。

一、基因诊断

基因诊断是直接检测基因的结构及其表达水平是否正常，从而对疾病作出诊断的方法，其优势有：①以基因作为检查材料和探察目标，属于"病因诊断"；②针对特定基因，特异性强；③所用技术具有放大效应，故诊断灵敏度高；④适用性强，诊断范围广。基因诊断的基本方法建立在核酸分子杂交、PCR 和 DNA 序列分析技术或几种技术联合使用基础之上。

1. DNA 序列分析 分离出患者的有关基因，测定其碱基排列顺序，找出变异所在是最为直接和确切的基因诊断法。由于 PCR 技术和 DNA 序列分析技术的迅速发展和推广，序列分析已经在技术上和经济上成为最佳的已知基因变异的诊断方法，代替了传统的限制性内切酶酶谱分析法（DNA 序列突变会导致某些限制性内切酶位点的改变，DNA 酶切片段的大小或多少将表现为电泳迁移率或信号强度的变化）。此法主要用于基因突变类型已经明确的遗传病的诊断及产前诊断。

2. PCR 技术 PCR 技术具有高度特异、高度敏感和快速的特点，在诊断方面主要用于：①快速检出样品中的痕量病原微生物（只要基因序列已知），如组织和血液中 SARS 病毒、各型肝炎病毒等的检测。②微量 DNA 样品中的基因及基因变异分析。根据待测基因两端的 DNA 顺序设计引物，经 PCR 反应将目的基因片段扩增出来，即可进一步分析判断致病基因的存在与否，并了解其变异的形式。③用于个体识别、亲缘关系鉴定、器官移植术前组织配型、基因连锁分析等等。多重 PCR 技术（在同一反应中采用多对引物同时扩增几个不同的 DNA 片段）和目前已发现的一些遗传标志相结合可以实现这一目的。例如，DNA 指纹（fingerprint）技术，检测的是基因组 DNA 中存在的一类特殊的数目可变串联重复多态性（variable number of tandem repeats polymorphism，VNTR）。该技术的使用已经替代了传统的 DNA 限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）分析法。

3. 基因芯片（gene chip） 基因芯片在医学诊断中主要用于：①样品中痕量病原微生物的迅速检出、分类及分型；②分析样品中可能存在的多种不同基因变异方式；③基于对药物敏感相关基因变异的认识，分析样品中耐药菌株的存在和个体对药物或毒物的敏感性；④基于对致病相关基因和个体单核苷酸多态性（SNP）的认识，分析个体的疾病易感状态，如肿瘤、自身免疫病发生的预警。

二、基因治疗

如前所述，各种疾病的发生均与基因结构变异或表达异常密切相关，因此理想的根治手段应是在基因水平上予以纠正。从广义上来讲，将某种遗传物质转移到患者细胞内，使其在体内发挥作用，以治疗疾病的方法，均谓之基因治疗。

（一）基因治疗的基本策略

1. 缺陷基因精确的原位修复　包括对致病基因的突变碱基进行纠正的基因矫正（gene correction）和用正常基因通过重组原位替换致病基因的基因置换（gene replacement）。这两种方法均是对缺陷基因精确的原位修复，不涉及基因组的任何改变，是最为理想的治疗方法，但技术上目前尚未突破。

2. 基因增补（gene augmentation）　指将目的基因导入病变细胞或其他细胞，不去除异常基因，而是通过目的基因的非定点整合，使其表达产物补偿缺陷基因的功能或使原有的功能得以加强。目前基因治疗多采用此种方式。

3. 基因失活（gene inactivation）　将特定的序列导入细胞后，在转录或翻译水平阻断致病基因的异常表达。可用技术包括反义核酸、核酶及小干扰 RNA 等。小干扰 RNA 技术作为一种新兴的基因失活策略，正受到广泛关注。

4. 基因疫苗　作为继死疫苗及减毒活疫苗、亚单位疫苗和重组疫苗后的第三代疫苗，基因疫苗主要指的是 DNA 疫苗。DNA 疫苗将编码外源性抗原的基因插入到真核表达质粒中，直接导入人体内，抗原基因在一定时限内的持续表达，不断刺激机体免疫系统，达到防病或治病目的。

（二）基因治疗的基本程序

1. 治疗性基因的选择　选择对疾病有治疗作用的特定目的基因是基因治疗的首要问题。对于单基因缺陷的遗传病而言，其野生型基因即可被用于基因治疗。

2. 基因载体的选择　目前使用的携带治疗性基因的载体有病毒载体和非病毒载体两大类。基因治疗的临床实施一般多选用病毒载体。目前被用作基因转移载体的病毒有逆转录病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒等，在实际应用中各有优缺点。

3. 靶细胞的选择　根据受体细胞种类不同，基因治疗分为体细胞（somatic cell）的基因治疗和生殖细胞（germ line cell）的基因治疗两大类。出于安全性和伦理学考虑，目前禁止使用生殖细胞进行基因治疗，仅限于使用体细胞。已使用的靶细胞有淋巴细胞、造血细胞、上皮细胞、内皮细胞、肌细胞和肿瘤细胞等。

4. 基因转移（gene transfer）　如何有效地将外源治疗性基因导入受体细胞，是基因治疗研究中的一个重要环节。在人类基因治疗实施方案中体内基因导入的方式有两种：一种是间接体内疗法（ex vivo），即在体外将外源基因导入靶细胞内，再将这种基因修饰过的细胞回输病人体内，使带有外源基因的细胞在体内表达相应产物，以达到治疗的目的。其基本过程类似于自体组织细胞移植。另一种是直接体内疗法（in vivo），即将外源基因直接导入体内有关的组织器官，使其进入相应的细胞并进行表达。

世界上第一例基因治疗病例

人类历史上第一个基因治疗方案应用于一患腺苷脱氨酶（ADA）缺乏症的 4 岁女孩。ADA 缺陷将导致 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞发育受阻，病人发生重症联合免疫缺陷。1990 年，美国批准了 ADA 缺陷的基因治疗方案。患儿血细胞中的单个核细胞在体外进行培养增殖并用携带 ADA 基因的逆转录病毒转染，数日后将细胞输回患儿体内。在 10 个半月中，患儿共接受了 7 次携带 ADA 基因的逆转录病毒转染的自体细胞输注，免疫功能增强，临床症状改善。单个核细胞群中 ADA 含量的 PCR 分析表明，在血液中约有相当于正常人的 20%～25%的 ADA 基因转染细胞。患儿基因治疗奏效后较少发生感染，且未见由细胞输注和 ADA 基因转移自身带来的副作用。

基因治疗作为一门新兴学科，在很短的时间内就从实验室过渡到临床，已被批准的基因治疗方案有百种以上，包括肿瘤、艾滋病、遗传病和其他疾病等。在我国，血管内皮生长因子（VEGF）、血友病Ⅸ因子、抑癌基因 p53 等基因治疗的临床方案已进入市场或临床试验。

在现阶段，基因治疗还有许多理论、技术和伦理问题有待探讨，对于其潜在的风险也需要充分的认识。哺乳类动物细胞中基因表达调控的机制尚未完全阐明，如何使外源基因的表达随体内环境需要实现安全、高效、靶向、可控在目前尚无良策；导入基因的随机整合造成的插入突变几率极低，但仍具有潜在的危险。尽管人类基因治疗仍存在上述问题，但可以预期，基因治疗的成功将对人类健康做出重要贡献。

小 结

本章概括介绍了目前医学分子生物学中有关的部分常用技术。

印迹技术可以将在凝胶中分离的生物大分子转移或直接放在固相介质上并加以检测分析。探针具有特定的序列，能够与待测的核酸片段互补结合，可以用放射性核素或其他化合物标记，因此可以用于检测核酸样品中的特定基因。印迹技术包括 DNA 印迹技术、RNA 印迹技术和蛋白质印迹技术。

PCR 技术以 DNA 分子为模板，以 1 对与模板序列相互补的寡核苷酸片段为引物，在 DNA 聚合酶的作用下，合成新的 DNA 链，重复这一过程，可使目的 DNA 片段得到 100 万倍以上的扩增。PCR 的基本反应步骤包括变性、退火和延伸。PCR 技术主要用于目的基因的克隆、基因的体外突变、DNA 和 RNA 的微量分析、DNA 序列测定和基因突变分析。

无论手工测定还是自动化测定 DNA 序列的技术原理均建立在化学裂解法或 DNA 链末端合成终止法的基础之上。目前，DNA 自动测序已基本取代了手工测序。

基因文库可分为基因组 DNA 文库和 cDNA 文库。基因组 DNA 文库以 DNA 片段的形式贮存着某一生物全部基因组 DNA 信息。cDNA 文库是指包含某一组织细胞在一定条件下表达的全部 mRNA 逆转录而合成的 cDNA 序列的克隆群体，它以 cDNA 片段的形式贮存着该组织细胞的基因表达信息。

生物芯片包括基因芯片和蛋白质芯片。基因芯片主要用于基因表达检测、基因突变检测、功能基因组学研究、基因组作图和新基因的发现等多个方面。蛋白质芯片广泛应用于蛋白质表达谱、蛋白质功能、蛋白质间的相互作用的研究。

分析各种蛋白质、蛋白质-DNA、蛋白质-RNA 复合物的组成和作用方式是理解生命活动的基础。酵母双杂交技术和标签蛋白沉淀是目前分析细胞内蛋白质相互作用的主要手段。蛋白质与 DNA 相互作用是基因表达及其调控的基本机制，EMSA 和 ChIP 是目前最常用的在体外和体内分析 DNA 与蛋白质相互作用的方法。

转基因动物、动物整体克隆技术、基因剔除技术在建立疾病的动物模型、探讨疾病的发生机制方面具有重要价值，更为重要的是可以作为新的治疗方法和新的药物的筛选系统。

人类的绝大多数疾病都与基因变异密切相关。从基因水平探测、分析病因及疾病的发病机制，并采用针对性的手段矫正疾病紊乱状态，是医学发展的新方向。基因诊断和基因治疗已成为现代分子医学的重要内容。

（药立波）

主要参考资料

1. 周爱儒. 生物化学. 第六版. 北京：人民卫生出版社，2004
2. 贾弘禔. 生物化学. 北京：人民卫生出版社，2005
3. 贾弘禔. 生物化学. 第二版. 北京：北京大学医学出版社，2005
4. David L. Nelson，Michael M. Cox. Lehninger Principles of Biochemistry. 4th ed. New york：W. H. Freeman and company，2005
5. Rorbert K. Murray，Daryl K. Granner，Peter A. Mayes，et al. Harper's Biochemistry. 27th ed. New york：McGraw Hill company，2006
6. Reginald H. Garrett，Charles M. Grisham. Biochemistry. 3rd ed. Thomson Books/Cole，Belmont USA. 2005

名词释义

cDNA 文库（cDNA library） 是包含某一组织细胞在一定条件下所表达的全部 mRNA 经逆转录而合成的 cDNA 序列的克隆群体，它以 cDNA 片段的形式贮存该组织细胞的基因表达信息。

DNA 印迹（DNA blot） 亦称 Southern blot。将电泳分离的 DNA 片段变性为单链后转移到膜性材料，在含有探针的溶液中进行杂交反应，用于基因组 DNA 的定性和定量分析。

DNA 变性（DNA denature） 双链 DNA 在变性因素（如加热、过酸性条件、过碱性条件等）影响下，解离成为两条单链的过程称之为 DNA 变性。

GTP 酶超家族（GTPase superfamily） 一组 GTP 结合蛋白，包括结合 GDP 失活和结合 GTP 激活两种互变形式；这些蛋白质包括 G 蛋白、Ras 蛋白和某些多肽延长因子，是细胞内信号通路的开关分子。

G 蛋白偶联受体（G protein-coupled receptor） 亦称七跨膜受体；一类重要的细胞表面受体，具有 7 个跨膜 α-螺旋，并直接与异源三聚体 G 蛋白偶联结合，依靠活化 G 蛋白转导细胞外信号。

Klenow 片段（Klenow fragment） 是原核生物 DNA-pol Ⅰ经特异的蛋白质酶水解后产生的大片段，具有 5′→3′核酸外切酶活性和聚合活性。在实验室合成 DNA 及分子生物学研究上，常用 Klenow 片段代替 DNA 聚合酶。

LDL 受体（LDL receptor） 介导 LDL 内吞的脂蛋白受体，又称 apoB、apoE 受体，广泛分布于肝、动脉壁细胞等各组织的细胞膜表面。

RNA 复制（RNA replication） 由 RNA 依赖的 RNA 聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase）催化合成 RNA 的过程，常见于病毒，是逆转录病毒以外的 RNA 病毒在宿主细胞以病毒的单链 RNA 为模板合成 RNA 的途径。

RNA 干涉（RNA interference，RNAi） 是由双链 siRNA 介导的抑制靶基因表达的现象，又可以作为一种生物技术应用于功能基因组研究。

RNA 剪接（RNA splicing） 初级 RNA 转录物切除内含子、连接外显子，转录后加工的形式之一。

RNA 剪切（RNA cleavage） 剪去 RNA 中的某些内含子，并在上游的外显子 3′端直接进行多聚腺苷酸化，不进行相邻外显子之间的连接反应。

RNA 聚合酶（RNA polymerase） 以 DNA 或 RNA 为模板，以 5′三磷酸核苷为原料催化合成 RNA 的酶。

RNA 印迹（RNA blot） 亦称 Northern blot。利用与 DNA 印迹相类似的技术来分析 RNA 分子，主要用于检测某一组织或细胞中已知的特异 mRNA 的表达水平，也可以比较不同组织和细胞中的同一基因的表达情况。

SH2 结构域（SH2 domain） 存在于一些蛋白质分子中的一个可以识别和结合其他一些蛋白质中的磷酸化酪氨酸模体的结构域，最初在与 src 癌基因家族产物同源的受体酪氨酸激酶中发现，但是与其 SH1 催化域不同而被命名为 SH2 域。是可与某些蛋白质（如受体酪氨酸激酶）的磷酸酪氨酸残基紧密结合的蛋白质结构域，启动信号转导通路中的多蛋白质复合物的形成。

α-螺旋（α-helix） 多肽链的一种螺旋构象，通常为具有最大氢键联系的右手螺旋；

蛋白质中常见的二级结构形式之一。

β-氧化（β-oxidation） 脂酸氧化降解的主要途径，从烃链羧基端 β-碳原子开始氧化。

半保留复制（semiconservative replication） DNA 复制是以 DNA 的两条链为模板，以 dNTP 为原料，在 DNA 聚合酶的作用下按照碱基配对规律合成新的互补链，这样形成的两个子代 DNA 分子与原来的 DNA 分子完全相同，故称之为复制，又因子代 DNA 分子的双链其中一条来自亲代，另一条是新合成的，故名半保留复制。

半寿期（half-life） 一个体系中的特定成分减少或消失一半所需要的时间。

必需脂酸（essential fatty acid） 一组由植物合成，人体不能合成，必须从食物获得的多价不饱和脂酸，主要包括亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸。

变构调节（allosteric regulation） 小分子化合物结合于酶蛋白活性中心以外的调节部位，引起酶分子构象改变，从而改变酶的活性。

变构效应（allosteric effector） 也称别位效应。小分子化合物或配基与调节分子（酶、蛋白质）结合后引起其构象变化，调节分子功能。

不对称转录（asymmetric transcription） 基因组中，按细胞不同的发育时序、生存条件和生理需要，只有少部分的基因发生转录。在 DNA 分子双链上，一股链用作模板指引转录，另一股链不转录。

层析（chromatography） 利用物质分子在流动相与固定相之间分配比例不同，将不同物质分子的混合物分离的一种技术。例如薄层层析、柱层析等。

层粘连蛋白（laminin） 一种细胞外基质成分，存在于所有基底膜（多黏着蛋白）；是由 3 肽链组成的大分子、含细胞表面受体、胶原（蛋白）、硫酸肝素蛋白聚糖等多种结合位点。

初级胆汁酸（primary bile acids） 肝细胞以胆固醇为原料合成的胆汁酸与甘氨酸或牛磺酸的结合产物，包括胆酸、鹅脱氧胆酸、甘氨胆酸、牛磺胆酸、甘氨鹅脱氧胆酸和牛磺鹅脱氧胆酸。

初级转录物（primary transcript） 即转录后加工前的 RNA 产物。

次级胆汁酸（secondary bile acids） 初级胆汁酸经肠菌产生的胆汁酸及其结合产物，包括脱氧胆酸、石胆酸、甘氨脱氧胆酸、牛磺脱氧胆酸、熊脱氧胆酸等。

单顺反子（monocistron） 真核基因的一个编码基因转录只生成一种 mRNA 分子、经翻译生成一种多肽链。

蛋白激酶（protein kinase） 将 ATP 或其他核苷三磷酸的 γ-磷酸基转移给靶蛋白的 Ser、Thr、Tyr、Asp 或 His 的侧链的一类酶。磷酸供体可以是 ATP，也可以是其他类三磷酸核苷酸。可以调节被磷酸化的蛋白分子的功能。

蛋白聚糖（proteoglycans） 属于蛋白质-糖复合物家族，分子中含有一个核心蛋白，核心蛋白结合一个或多个糖胺聚糖链。存在于几乎所有细胞外基质，或结合于浆膜。

蛋白质相互作用结构域（protein interaction domain） 由 50 ～100 个氨基酸构成的，在细胞信号转导通路和网络中介导信号转导分子的相互识别和结合的结构域，有多种类别（例如 SH2、SH3 等等）。每一类的不同成员之间的空间结构类似，一级结构具有一定同源性。

蛋白质变性（protein denature） 多肽链、蛋白质的特定空间构象的部分或完全非折叠过程或形式。

蛋白质靶向输送（protein targeting） 蛋白质合成后被定向输送到其发挥作用的靶部位的过程。

蛋白质等电点（isoelectric point，pI） 一种蛋白质净电荷为零时的溶液 pH，此时该

蛋白质在电场中无移动。

氮平衡（nitrogen balance） 机体吸收氮与排泄氮之间的（差异）关系。

第二信使（second messenger） 细胞对细胞外信号，如激素（第一信使）产生应答时合成的能扩散、调节信号转导蛋白活性的小分子或离子。例如钙离子、cAMP、cGMP、DAG、IP_3、NO等等，是细胞信号跨膜转导的信使分子。

端粒（telomeres） 是真核生物染色体线性DNA分子末端的结构。形态学上，DNA末端与它的结合蛋白质紧密结合，像两顶帽子那样盖在染色体两端，使染色体DNA末端膨大成粒状。

多胺（polyamine） 由鸟氨酸、S-腺苷甲硫氨酸等衍生的聚阳离子化合物，包括腐胺、精胺和精脒；具有调节细胞分裂、生长等作用。

多聚核蛋白体（polysome） 由多个核蛋白体结合在一条mRNA链上，同时进行多肽链的合成（翻译）所形成的聚合物称为多聚核蛋白体。

翻译（translation） 细胞内以mRNA为模板、按照mRNA分子中由核苷酸组成的密码信息合成蛋白质，由于mRNA中的核苷酸排列顺序与蛋白质中的氨基酸排列顺序是两种不同的分子语言，所以将蛋白质的生物合成称为翻译。

翻译后修饰（posttranslational modification） 新生多肽链经过复杂的加工过程转变为具有天然构象的功能蛋白质。翻译后修饰包括多肽链折叠为天然的三维构象及对肽链一级结构的修饰、空间结构的修饰等。

反式作用因子（trans-acting factor） 也称真核转录调节因子。由它的编码基因表达后，通过与特异的顺式作用元件识别、结合，反式激活另一基因的转录。

泛素（ubiquitin） 一种高度保守的小分子蛋白质；在细胞内蛋白质的蛋白酶体降解途径中，在特异泛素化酶催化下，几个泛素分子串联地共价结合至靶蛋白的赖氨酸残基。

非蛋白氮（non protein nitrogen，NPN） 非蛋白质类含氮化合物中的氮总称，这些化合物主要有尿素、肌酸、肌酸酐、尿酸、胆红素和氨等。

分子伴侣（molecular chaperon） 是细胞内一类可识别肽链的非天然构象、促进各功能域和整体蛋白质正确折叠的保守蛋白质。

冈崎片段（Okazaki fragments） DNA复制时，随从链复制中形成的不连续片段。

共价修饰（covalent modification） 又称化学修饰。DNA、蛋白质分子在酶的催化下，共价结合某个化学基团，同时又可在另一种酶的催化下，将结合的化学基团去除，从而对分子功能产生影响。

固醇类（sterols） 以环戊烷多氢菲为母体结构的类脂。

管家基因（housekeeping gene） 对生命全过程都是必需的或必不可少的一类基因。这类基因在一个生物个体的几乎所有细胞中持续表达。

核蛋白体循环（ribosomal cycle） 在肽链合成的延长阶段，经进位、成肽和转位三个步骤而使氨基酸依次进入核蛋白体并聚合成多肽链的过程。这一过程在核蛋白体上连续循环进行，直至终止阶段。每经过一次核蛋白体循环，肽链中增加一个氨基酸残基。广义的核蛋白体循环是指翻译的全过程。

核酶（ribozyme） 具有催化活性的核糖核酸。

核酸分子杂交（nucleic acid hybridization） 在溶液中，不同来源的DNA经热变性后，慢慢冷却使其复性，异源DNA单链间通过碱基配对原则，形成杂交DNA双链分子，称为核酸分子杂交。也可以是DNA与互补的RNA之间，RNA与RNA之间的核酸分子杂交。

核小RNA（small nuclear RNA，snRNA） 细胞核内的小RNA，在mRNA、tRNA和

rRNA 的剪接反应中去除内含子过程发挥作用。

黑色素（melanin） 存在于皮肤、毛发等的黑色色素；酪氨酸在黑素细胞中氧化为多巴，再氧化聚合形成的褐色颗粒。

化学渗透假说（chemiosmotic hypothesis） 电子传递释放的能量通过泵出质子，以形成跨膜质子电化学梯度（质子浓度和跨膜电位差）的形式储存能量，在质子顺梯度回流时促进 ATP 合成。

黄疸（jaundice） 胆红素为橙黄色物质，血浆胆红素高于正常水平时可扩散进入组织造成黄染，这一体征称为黄疸。

基因（gene） 是位于染色体上的遗传基本单位或单元，是负载特定遗传信息的 DNA 片段，可以编码单个具有生物功能的产物，包括 RNA 和多肽链。

基因表达（gene expression） 是基因转录或（和）翻译的过程。

基因剔除（gene knock out） 建立在同源重组基础上的有目的地去除细胞或动物体内某种基因的技术。

基因芯片（gene chip） 指在单位面积有规律地紧密排列特定的 DNA 片段的支持物，亦被称作 DNA 微阵列。

基因诊断（gene diagnosis） 直接检测体内基因或外源感染基因的结构及其表达水平是否正常，从而对疾病作出诊断的方法。

基因治疗（gene therapy） 将某种遗传物质转移到患者细胞内，使其在体内发挥作用，以治疗疾病的方法。

基因组（genome） 一个生物体的全部遗传信息，即 DNA 的全部核苷酸序列。

基因组 DNA 文库（genomic DNA library） 以 DNA 片段的形式贮存着某一生物的全部基因组 DNA（包括所有的编码区和非编码区）信息。

基因组印记（genomic imprinting） 基因组印记是指同一等位基因根据其是母方还是父方的来源进行选择性差异表达的现象。

剪接体（spliceosome） 在真核 mRNA 前体剪接中，由 snRNA（如 U1、U2、U4、U5 和 U6 等）和蛋白质组成的复合体。

结合胆红素（conjugated bilirubin） 胆红素在肝细胞内主要与葡糖醛酸结合，生成的胆红素称为结合胆红素，为水溶性，可从尿中排出。

解偶联剂（uncoupler） 某些物质可破坏氧化呼吸链电子传递过程形成的跨线粒体内膜电化学梯度，抑制 ATP 的生成，更多能量以热能散失。

聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR） 是一种可以在体外扩增特定 DNA 片段的方法。以 DNA 分子为模板，以一对与模板互补的寡核苷酸片段为引物，反复进行变性、退火和延伸，在 DNA 聚合酶作用下，即可使目的 DNA 片段得到扩增。

开放阅读框架（open reading frame，ORF） 从 mRNA 序列 5′-端的起始密码子 AUG 到 3′-端终止密码子之间的核苷酸序列，称为开放阅读框架，通常的 ORF 包含 500 个以上的密码子。

空间特异性（spatial specificity） 是指多细胞生物个体在某一特定生长发育阶段，同一基因在不同的组织器官表达不同，又称细胞特异性（cell specificity）或组织特异性（tissue specificity）。

框移突变（frame shift mutation） 指三联体密码的阅读方式改变，造成蛋白质氨基酸排列顺序发生改变，其后果是翻译出的蛋白质可能完全不同。

磷脂（phospholipid） 含有一个或多个磷酸基的脂类化合物，是甘油磷脂和鞘磷脂的总称。

磷脂酶（phospholipase） 水解磷酸甘油酯分子中不同酯键的一类酶。

螺旋-环-螺旋（helix-loop-helix） 存在于很多单体 Ca^{2+}-结合蛋白和真核转录调节因子中的一种保守的模体。

酶偶联受体（enzyme-linked receptor） 自身具有酶活性或者自身没有酶活性，但与酶分子结合存在的一类受体，如生长因子和细胞因子的受体。这些受体大多为单次跨膜的糖蛋白，亦称单次跨膜受体。

密码子（codon） 在 mRNA 的开放阅读框架区，以每 3 个相邻的核苷酸为一组，代表一种氨基酸或肽链合成的其他信息，这种三联体形式的核苷酸序列称为密码子。共有 64 个密码子，密码子的阅读方向是 5′→3′。

免疫印迹（immunoblot） 亦称 Western blot。蛋白质在电泳之后转移和固定到膜型材料上，用抗体来检测相应蛋白分子的存在，用于检测样品中特异性蛋白质的存在、细胞中特异蛋白质的半定量分析。

模体（motif） 在一个或几个蛋白质中出现的 2 个或 2 个以上的二级结构元件的不同折叠形式，又称“折叠”或超二级结构。也是在 DNA 中对特殊序列的描述。

膜受体激素（membrane receptor hormone） 蛋白质、多肽类等亲水性激素，其受体是细胞表面质膜上的跨膜糖蛋白，称为膜受体激素。该激素通过结合膜受体，跨膜传递信号，引起生理效应。

内含子（intron） 真核生物中隔断基因的线性表达，而在剪接过程中被除去的核酸序列。

内源性途径（intrinsic pathway） 是指血液在血管内膜受损或在血管外与异物表面接触时触发的凝血过程。该凝血过程可人为地分为三个阶段：①接触活化阶段，在此阶段因子Ⅻ和Ⅺ得以活化；②因子Ⅸ的激活；③因子Ⅹ的激活。

逆转录（reverse transcription） 以 RNA 为模板在逆转录酶的作用下合成 DNA 的过程。逆转录在病毒致癌过程中起着重要作用。在基因工程中，可用于以 mRNA 为模板合成 cDNA。

逆转录 PCR（reverse transcription PCR，RT-PCR） 是将 RNA 的逆转录反应和 PCR 反应联合应用的一种技术。以 RNA 为模板，在逆转录酶的作用下合成 cDNA，再以 cDNA 为模板通过 PCR 反应来扩增目的基因。RT-PCR 是目前从组织或细胞中获得目的基因以及对已知序列的 RNA 进行定性及半定量分析的最有效方法。

鸟氨酸循环（ornithine cycle） 肝中利用氨合成尿素的代谢通路，又称尿素循环。

鸟苷酸结合蛋白（guanine nucleotide binding protein，G protein） 简称 G 蛋白。指具有结合 GDP 失活、结合 GTP 激活两种互变形式和固有 GTP 酶活性，在细胞信号通路中起信号转换器或分子开关作用的一组蛋白质。主要指与细胞表面 7 跨膜受体结合的异源三聚体 GTP-结合蛋白和一类低分子量单体 G 蛋白（如 Ras）。

配体-门控受体型离子通道（ligand-gated receptor channel） 一类受控于配体的离子通道，由化学配体（神经递质）控制开关。受体本身是通道的组成部分，在与配体结合后受体的构象改变而将通道打开。它们的配体通常是神经递质。这种通道以所结合的配体来命名。

启动子（promoter） 是 RNA 聚合酶结合的、在转录起始上游的 DNA 序列。RNA 与之结合后（如不受到阻遏）即可启动转录。

启动子上游元件（upstream promoter element） 位于启动子上游的 DNA 序列，多在转录起始点－40～－100nt 的位置，比较常见的是 GC 盒和 CAAT 盒，从近端调控转录起始复合物的效率和专一性。

切除修复（excision repair） 细胞内最重要的修复机制，主要由 DNA 聚合酶 I 及连接酶执行。

乳糜微粒（chylomicron，CM） 是脂蛋白的一种形式，由小肠黏膜细胞合成的甘油三酯，与磷脂、$apoB_{48}$等构成。主要功能为转运外源性甘油三酯和胆固醇。

乳糖操纵子（*lac* operon） 大肠杆菌中与乳糖代谢功能相关的基因成簇地串联在一起共同组成一个转录单位即乳糖操纵子，包括：Z、Y 及 A 三个结构基因，一个操纵序列 O，一个启动序列 P 及一个调节基因 I。

生物转化（biotransformation） 机体对内、外源性的非营养物质进行的氧化、还原、水解以及各种结合反应，增加其水溶性，利于从尿或胆汁排出体外的过程。

时间特异性（temporal specificity） 某一特定基因的表达严格按一定的时间顺序发生，又称为阶段特异性（stage specificity）。

实时 PCR（real-time PCR） 技术 利用荧光标记引物动态监测 PCR 反应过程中的产物量，消除了产物堆积对定量分析的干扰，亦被称为定量 PCR。

顺式作用元件（cis-acting element） 在转录起始点上游参与转录调控的 DNA 序列。

肽键（peptide bond） 一个氨基酸的 α-氨基与另一个氨基酸的 α-羧基脱水而形成的酰胺键。

探针（probe） 是带有放射性核素或其他标记的核酸片段，它具有特定的序列，能够与待测的核酸片段互补结合，因此可用于检测核酸样品中存在的特定基因。

糖胺聚糖（glycosaminoglycan） 蛋白聚糖分子中聚糖部分的总称。由二糖重复单位组成。通常其中之一是 *N*-乙酰氨基葡萄糖或 *N*-乙酰氨基半乳糖，另一个是糖醛酸（多见）、*D*-葡萄糖醛酸或 *L*-艾杜糖醛酸，并且糖基的羟基常常被硫酸酯化。糖胺聚糖泛指硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、透明质酸、肝素及硫酸乙酰肝素等。

糖蛋白（glycoprotein） 含共价结合的糖类基团的蛋白质。

糖复合物（glycoconjugate） 糖基分子与蛋白质或脂以共价键结合而形成的化合物。是糖蛋白、蛋白聚糖、肽聚糖、糖脂及脂多糖的统称。

糖基化（glycosylation） 非糖生物分子与糖形成共价结合的过程（反应）。

糖基转移酶（glycosyltransferase） 催化糖基从糖基供体（常为核苷二磷酸糖化物）转移到受体化合物（蛋白质、脂或另一糖分子）的酶。

糖生物学（glycobiology） 研究糖类及其衍生物的结构、代谢以及生物学功能，探索糖链的生物信息机制与生命现象关系的专门领域。

糖脂（glycolipid） 含糖基的脂类分子，泛指甘油糖脂、鞘糖脂、脂多糖等。

铁蛋白（ferritin） 由 24 个亚基组成的中空蛋白质分子，可结合 450 个铁离子（Fe^{3+}），是体内铁的储存形式。

酮体（ketone bodies） 指脂酸在肝脏线粒体内分解时产生的特有的中间产物——乙酰乙酸、β-羟丁酸及丙酮的总称。

退火（annealing） 变性的双链 DNA 经缓慢冷却后，两条互补链可以重新恢复天然的双螺旋构象的过程。

外显子（exon） 在真核生物中断裂基因及其初级转录产物上出现，并表达为成熟 RNA 的核酸序列。

外源性途径（extrinsic pathway） 是指组织因子（因子Ⅲ）暴露于血液而启动的凝血过程。

微量元素（microelement） 人体每日需要量在 100mg 以下的化学元素，主要有铁、碘、铜、锌、锰、硒、氟、钼、钴、铬等。其功能主要作为酶的辅助因子发挥其生理

功能。

微小 RNA（microRNA，miRNA） 是一类长度约 20～25 个碱基的小分子非编码单链 RNA，可以通过与靶 mRNA 分子的 3′端非编码区域结合，抑制该 mRNA 分子的翻译，对基因表达发挥调节作用。

维生素（vitamin） 人体内不能合成或合成量甚少，必须由食物供给的一组低分子量有机化合物。其主要功能是调节人体物质代谢和维持正常生理功能等。按其溶解性质分为脂溶性维生素和水溶性维生素。

维生素 C（vitamin C） 水溶性维生素，是许多羟化酶的辅助因子，直接影响某些氨基酸、胆固醇、胶原的代谢，又是水溶性抗氧化剂，其缺乏可引起坏血病。

未结合胆红素（unconjugated bilirubin） 在血浆中主要与清蛋白结合而运输的胆红素称为未结合胆红素。为脂溶性，不能经尿排出，易透过细胞膜产生毒性作用。

细胞色素（cytochrome） 是一类以血红素为辅基的蛋白质，可在生物氧化呼吸链、光合作用及其他氧化还原反应中作为单电子传递体。

细胞色素 P_{450} 单加氧酶（cytochrome P_{450} monooxygenase） 又称羟化酶、混合功能氧化酶，是存在于肝微粒体的氧化还原酶类，由细胞色素 P_{450} 和 NADPH-P_{450} 还原酶组成。

细胞外基质（extracellular matrix） 由动物细胞分泌的、包括各种多糖、纤维蛋白和黏着蛋白等的可溶性组成结构。为组织提供结构支持，并影响细胞的发育和细胞的生物化学功能。

纤溶酶（plasmin） 特异的催化纤维蛋白或纤维蛋白原水解的酶。

纤连蛋白（fibronectin） 一类细胞外粘连蛋白，可与其他细胞外基质组分、血纤维蛋白、整合蛋白家族的细胞表面受体结合，其功能是连接细胞与细胞外基质，参与损伤愈合。

酰基载体蛋白（acyl carrier protein,） 是脂酸合成过程中脂酰基的载体，脂酸合成的各步反应均在酰基载体蛋白的辅基上进行。其辅基与 CoA-SH 相同，为磷酸泛酰氨基乙硫醇。

限速酶（rate-limiting enzymes） 是催化代谢途径中需要最大激活能或最高自由能转换状态反应的酶，是该途径一系列酶促反应中，催化速度最慢的酶，常具有调节作用。

小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA） 是一类双链 RNA 在特定情况下通过一定酶切机制，转变为具有特定长度（21～23 个碱基）和特定序列的小片段 RNA。双链 siRNA 与特异的靶 mRNA 完全互补结合，导致靶 mRNA 降解，阻断翻译过程。

锌指结构（zinc finger） 由蛋白质结构域围绕一个锌离子折叠形成的、保守的 DNA 结合蛋白模体。

信号肽识别颗粒（signal recognition particle，SRP） 由 6 个多肽亚基和 1 分子 7S-RNA 组成的复合体。可同时与新生肽链的信号肽及核蛋白体结合，具有 GTP 酶活性，能引导新生肽链识别并结合到内质网膜上。

信号序列（signal sequence） 所有靶向输送的蛋白质结构中存在分选信号，主要是存在于 N-末端的可被细胞转运系统识别的特征性氨基酸序列，可引导蛋白质转移到细胞的适当靶部位，这类序列称为信号序列。

信号转导（signal transduction） 生物细胞对来自外界的刺激或信号发生反应，细胞外信号（化学的、机械的或电的）被放大、转换，并据以调节细胞代谢、增殖、分化、功能活动和凋亡的过程。这个过程对细胞之间的相互作用和机体的和谐统一具有重要作用。

氧化呼吸链（oxidative respiratory chain） 又称电子传递链，指线粒体内膜中按一定顺序排列的一系列具有电子传递功能的酶复合体，可通过链锁的氧化还原反应将电子最终

传递给氧生成水。

氧化磷酸化（oxidative phosphorylation） 即由代谢物脱下的氢，经线粒体氧化呼吸链电子传递释放能量，偶联驱动 ADP 磷酸化生成 ATP 的过程。

引发体（primosome） 是复制起始时形成的，在原核生物 DnaB（解螺旋酶）、DnaC、DnaG（引物酶）等蛋白质结合到 DNA 起始复制区域形成的复合结构。

载脂蛋白（apolipoprotein，apo） 脂蛋白的蛋白质部分。在结合和转运脂质及稳定脂蛋白的结构上发挥着重要作用，而且还调节脂蛋白代谢关键酶活性，参与脂蛋白受体的识别。

增强子（enhancer） 增强子是能够结合特异基因调节蛋白，促进邻近或远处特定基因表达的 DNA 序列。增强子距转录起始点的距离变化很大，但总是作用于最近的启动子。

增色效应（hyperchromic effect） DNA 变性时，双螺旋变得松解，碱基暴露，使得含有 DNA 溶液在 260nm 的光吸收值升高的效应。

脂蛋白（lipoprotein） 脂-蛋白质的非共价聚合物，为血浆中水不溶性脂类的载体。

脂蛋白脂酶（lipoprotein lipase，LPL） 血管内皮细胞表面的一种水解血浆脂蛋白中甘油三酯的酶。

脂肪动员（fat mobilization） 是指储存在脂肪细胞中的甘油三酯，被脂酶逐步水解为游离脂酸和甘油并释放入血，通过血液运输至其他组织氧化利用的过程。

脂酶（lipase） 催化甘油三酯水解的酶。

转氨酶（transaminase） 是一类依赖维生素 B_6 催化氨基在氨基酸与 α-酮酸之间转移的酶。

转基因动物（transgenic animal） 将目的基因整合入受精卵细胞或胚胎干细胞，然后将细胞导入动物子宫，使之发育成个体的技术。

转录（transcription） 遗传信息从 DNA 传递到 RNA 的（RNA 聚合）酶促反应过程，即以 DNA 序列为遗传信息模板，催化合成序列互补 RNA 的过程。

转录后加工（post-transcriptional processing） 初级 RNA 转录产物的酶促反应过程；使 RNA 前体转变为有功能的 RNA 的过程。

转录因子（transcription factor） 为基因转录激活或增强转录频率所需要的所有 DNA 结合蛋白，分为基本转录因子和特异转录因子。又称转录调节因子或转录调节蛋白。

自身磷酸化（autophosphorylation） 狭义的指自身激酶活性催化蛋白质分子中的氨基酸残基的磷酸基修饰；广义的自身磷酸化包括同源二聚体蛋白激酶的两个单体相互催化的磷酸基修饰。

阻遏蛋白（repressors） 可以识别、结合特异 DNA 序列——操纵序列，抑制基因转录。

组成性基因表达（constitutive gene expression） 通常指类似于管家基因表达方式的基因表达。又称为基本表达。

汉 英 索 引

A

B

C

D

E

F

G

H

K

L

M

N

O

P

Q

R

S

T

W

X

Y

Z

英 汉 索 引

A

B

C

D

E

F

G

H

I

J

K

L

M

N

O

P

Q

R

T